

# **Idegi aktivitás térbeli követésére alkalmazott optikai jelek molekuláris komponenseinek azonosítása**

(Doktori értekezés)

**Pál Ildikó**

**ELTE TTK, Kémia Doktori Iskola (Dr. Inzelt György D.Sc.)**

**Szintetikus Kémia, Anyagtudomány, Biomolekuláris Kémia Doktori Program (Dr. Perczel András D.Sc.)**

Témavezető:

**Dr. Héja László**

**Tudományos főmunkatárs**

**MTA, TTK, Kognitív Idegtudományi és Pszichológiai Intézet,  
Funkcionális Farmakológiai Kutatócsoport**

2015

## Tartalomjegyzék

RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK .....	4
ÁBRAJEGYZÉK .....	5
TÁBLÁZATJEGYZÉK .....	6
1 IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	7
1.1 Ingerületátvitel a központi idegrendszerben .....	7
1.2 Az asztrociták szerepe az idegi aktivitás modulálásában .....	8
1.3 A hippocampusz anatómiai és fiziológiai jellemzői.....	11
1.4 Agyi aktivitás térbeli mérésére alkalmas módszerek.....	12
1.4.1 Mezőpotenciál, hippocampuszban mért mezőpotenciál jelek.....	12
1.4.2 Feszültségfüggő festék képalkotás .....	15
1.4.3 Belső optikai jel (Intrinsic Optical Signal - IOS) képalkotás .....	17
2 CÉLKITŰZÉSEK .....	20
3 KÍSÉRLETI MÓDSZEREK .....	21
3.1 Felhasznált anyagok .....	21
3.2 Túlélő agyszelet preparálás .....	21
3.3 Elektromos stimulálás és az elektrofiziológiai jelek regisztrálása .....	21
3.4 Festési protokollok .....	23
3.5 Képalkotási módszerek.....	23
3.6 Inhibitorok adagolása .....	25
3.7 Emelt $K^+$ koncentrációjú ACSF lokális adagolásával kiváltott IOS mérése .....	25
3.8 Az adatok értékelése .....	25
4 EREDMÉNYEK .....	28
4.1 AZ IOS idő- és térbeli lefutása, viszonya a mezőpotenciálhoz .....	28
4.1.1 Az IOS időbeli lefutása .....	28
4.1.2 Az IOS térbeli eloszlása és viszonya a mezőpotenciál jel paramétereire a CA1 különböző sejtrétegeiben .....	29
4.1.3 Az IOS terjedése.....	32
4.2 A VSD jel idő- és térbeli lefutása, aránya a mezőpotenciálhoz és az IOS-hoz .....	34
4.2.1 A VSD jel időbeli lefutása .....	34
4.2.2 A VSD jel térbeli eloszlása .....	35
4.2.3 A VSD jel terjedése.....	40
4.3 IOS és VSD jelek farmakológiai jellemzése .....	41

4.3.1	Az optikai jelek időbeli stabilitása .....	42
4.3.2	Az idegsejtek aktiválódása szükséges feltétele az optikai jelek kialakulásának	43
4.3.3	A glutaminsav receptorok szerepe az IOS és VSD jelek kialakításában .....	46
4.3.4	Az asztroglialis glutaminsav transzport szerepe az IOS és VSD jelek kialakításában.....	50
4.3.5	A $K^+/Cl^-$ kotranszport szerepe az optikai jelek kialakításában.....	54
4.3.6	Az asztrociták $K^+$ felvételének szerepe az IOS és a VSD jelek kialakításában .	58
4.3.7	Az anion csatornák szerepe az IOS és a VSD jelek kialakításában .....	63
4.3.8	Az asztrociták aktivációjának szerepe az IOS kialakításában.....	70
5	DISZKUSSZIÓ .....	72
5.1	Az IOS és a VSD jel legnagyobb része a posztzinaptikus glutamáterg aktivitás következménye .....	74
5.2	Az IOS nem követi a VSD jel által indukált membránpotenciál-változási mintázatot	76
5.3	Az EAAT2 transzporter részt vesz az IOS és a VSD jel kialakításában .....	77
5.4	Az neuronális KCC2 szerepét igazoltam, míg az asztroglialis NKCC1 szerepét kizártam az IOS kialakításában .....	80
5.5	Az asztrociták $K^+$ pufferekésének hozzájárulása az IOS és VSD jelekhez.....	82
5.6	Az anion csatornák részt vesznek az IOS és a VSD jel kialakításában.....	83
5.7	Az IOS térbeli eloszlása és mechanizmusa függ az alkalmazott stimulus típusától..	85
5.8	A $P2Y_1$ receptor nem járul hozzá az IOS kialakításához .....	85
5.9	Az IOS és a VSD jel feltételezett mechanizmusa.....	86
6	ÖSSZEFOGLALÁS .....	88
7	SUMMARY .....	89
8	IRODALOM JEGYZÉK .....	90
9	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS .....	108
10	MELLÉKLET .....	109

## RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ACSF- artificial cerebrospinal fluid, mesterséges agyfolyadék

AMPA – 2-amino-3-(5-metil-3-oxo-1,2-oxazol-4-il) propionsav

APV – DL-2-amino-5-foszfopentánsav

ATP – adenozin trifoszfát

BOLD – blood-oxygen-level dependent contrast imaging, vér oxigenációs szintjének változásán alapuló fMRI képalkotás

CA – cornu Ammonis

CCD - charge-coupled device, töltés-csatolt eszköz

CNQX - 6-ciano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion

DCPIB- 4- (2-butyl-6,7-dikloro-2-ciklopentilindán-1-on-5-il) oxibutánsav

DG – gyrus dentatus

DIDS - 4,4'-diisotiocianatoszilbén-2,2'-diszulfonsav

DMSO – dimetil-szulfoxid

EAAT2 – excitatory amino acid transporter 2

EEG - elektroencefalogram

EGTA - etilén-glikol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav

fEPSP – field excitatory postsynaptic potential, mező serkentő poszt-szinaptikus potenciál

Fluo-4 AM - Glicin, N-[4-[6-[(acetiloxi)metoxi]-2,7-difluoro-3-oxo-3H-xantén-9-il]-2-[2-[2-bis[2-[(acetiloxi)metoxi]-2-oxoetil]amino]-5-metilfenoxi]etoxi]fenil]-N-[2-[(acetiloxi)metoxi]-2-oxoetil]-, (acetiloxi)metilészter

fMRI – functional magnetic resonance imaging, funkcionális mágneses rezonancia képalkotás

FRET - Fröser rezonancia energia transzfer

GFP - green fluorescent protein, zöld fluoreszcens fehérje

HEPES - 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-3-ánc-szulfonsav

IOS - intrinsic optical signal, belső optikai jel

KCC2 –  $K^+/Cl^-$  kotranszporter 2

KCKF – karbonilcianid 3-klorofenilhidrazon

LFP – local field potential, lokális mezőpotenciál

MEA - multielectrode array, mátrix elektród

MRS2179 – 2'-deoxy-N<sup>6</sup>-metil adenozin 3',5'-difoszfát

NKA -  $Na^+/K^+$  ATPáz

NKCC1 –  $Na^+/K^+/Cl^-$  kotranszporter 1

NMDA – N-metil-D-aszparát

NPPB – 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoésav

PDA- photodiode array, fotodióda mátrix detektor

PS – population spike, populációs tüske

R123 - rhodamin 123

SHG - second harmonic generation, másodharmónikus generáláson alapuló optikai módszer

TTX – tetrodotoxin

VRAC-volume-regulated anion channel, térfogat-szabályozott anion csatorna

VSD – voltage-sensitive dye, feszültségfüggő festék

## ÁBRAJEGYZÉK

1. ábra: A hippocampusz keresztmetszeti képe.....	12
2. ábra: A hippocampusz CA1 régiójában mért mezőpotenciál jel komponensei. ....	14
3. ábra: Az egyszerre detektált mezőpotenciál, IOS és VSD jelek egymáshoz való viszonya.22	
4. ábra: A VSD jel validálása.. ....	24
5. ábra: A hippocampusz CA1 régiójában mért mezőpotenciál jel számolt komponensei. ....	26
6. ábra: Az IOS és a mezőpotenciál jel időbeli lefutása és a jelalak stimulusok számától való függése. ....	28
7. ábra: Az IOS és a mezőpotenciál jel időbeli lefutása és térbeli eloszlása. ....	30
8. ábra: A CA3 átvágásának hatása az IOS jel amplitúdójának eloszlására.....	31
9. ábra: Az IOS jel időbeli lefutása. ....	33
10. ábra: A VSD jel és az IOS időbeli összehasonlítása a kiváltott válasszal.....	35
11. ábra: A VSD jelalak és amplitúdó a különböző régiókban. ....	37
12. ábra: CA3 átvágásának hatása a VSD jel amplitúdójára. ....	38
13. ábra: A VSD jel és az IOS amplitúdója térbeli eloszlásának összehasonlítása.....	39
14. ábra: A VSD jel és IOS terjedési mintázatának összehasonlítása. ....	40
15. ábra: Mezőpotenciál jel, IOS és VSD jelek amplitúdójának stabilitása.....	43
16. ábra: Az IOS és VSD jelek függése az idegi aktivitástól. ....	44
17. ábra: A GABA <sub>A</sub> receptor gátlása növeli az IOS és VSD jelek amplitúdóját. ....	46
18. ábra: Az ionotróp glutaminsav receptorok gátlása csökkenti az IOS és VSD jeleket.....	49
19. ábra: Az asztrociták glutaminsav transzportjának gátlása csökkenti az IOS és VSD jelet	53

20. ábra: Az asztroglialis NKCC1 és a neuronális KCC2 együttes gátlása furoszemiddel a VSD jelet növeli, míg az IOS-t csökkenti, míg az NKCC1 gátlása bumetaniddal kis mértékben növeli az VSD jelet, míg az IOS-ra nem hat. ....	56
21. ábra: Az asztroglialis $K^+$ felvétel blokkolása az IOS-ra csak kis mértékben hat, míg a VSD jelet jelentősen csökkenti a CA3 és a DG régiókban.. ....	61
22. ábra: A $[Cl^-]$ és az anion csatornák szerepe az IOS és a VSD jelek kialakításában.....	64
23. ábra: Mitokondrium depolarizáció NPPB (100 $\mu$ M) hatására. ....	67
24. ábra: Az emelt $[K^+]$ ACSF injektálásával kiváltott IOS és az afferens ingerlés kiváltotta IOS tér és időbeli lefutása jelentősen különbözik.. ....	69
25. ábra: Asztrocita kalcium szignál kontroll és 5 $\mu$ M TTX adagolás alatt.....	71

## TÁBLÁZATJEGYZÉK

1. táblázat. 5 $\mu$ M TTX hatása a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre.....	43
2. táblázat. 100 $\mu$ M picrotoxin hatása a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre.....	45
3. táblázat. 20 $\mu$ M CNQX hatása a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre .....	47
4. táblázat. 20 $\mu$ M CNQX és 100 $\mu$ M APV együttes hatása a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre .....	47
5. táblázat. 300 $\mu$ M DHK adagolás hatása 5 és 15 perc adagolást követően a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre.....	50
6. táblázat. 5 mM furoszemid hatása 5 perc és 15 perc adagolás után a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre.....	55
7. táblázat. 10 $\mu$ M bumetanid hatása a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre .....	57
8. táblázat. 500 $\mu$ M $BaCl_2$ hatása a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre.....	59
9. táblázat. 3 $\mu$ M ouabain hatása 5 és 15 perc adagolást követően a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre .....	62
10. táblázat. 40 $\mu$ M DCPIB adagolás hatása a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre.....	65
11. táblázat. 100 $\mu$ M NPPB hatása 5 és 15 perc adagolást követően a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre.....	65
12. táblázat. 200 $\mu$ M DIDS hatása a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre .....	67
13. táblázat. 100 $\mu$ M MRS2179 adagolás hatása a mezőpotenciál, az IOS és VSD jelekre....	71

# 1 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Napjainkban igen nagy terhet ró a társadalomra az idegrendszer betegségeinek kezelési költsége. Európában az erre célra fordított összeg 2011-ben 798 milliárd Euro volt (Gustavsson et al., 2011), ami több mint 4-szerese a 2009-ben a szív és érrendszeri betegségekre fordított költségeknek (196 milliárd Euro (Nichols et al., 2012)). Ahhoz, hogy az idegrendszer betegségeit hatékonyan gyógyítani tudjuk, elengedhetetlen az idegrendszer működésének ismerete. Az idegrendszer működésének megismeréséhez pedig szükséges az idegi aktivitás tér- és időbeli követésére alkalmas módszerek fejlesztése, melyek egyúttal a betegségek diagnosztizálásában is segítségünkre lehetnek. Ebben a dolgozatban két, az idegi aktivitás tér- és időbeli követésére alkalmas képalkotó módszer komponenseinek in vitro vizsgálatát, valamint a két módszer összehasonlítását tűztem ki célul.

## 1.1 Ingerületátvitel a központi idegrendszerben

A központi idegrendszer alapvető egysége a neuron. A neuron fő részei a sejttest, a dendritok és az axon. A neuron ingerlékeny sejt, elektromos vagy kémiai inger hatására membránpotenciáljának megváltoztatásával reagál. Alapvetően két fő idegsejt típust különböztethetünk meg: serkentőt és gátlót, utóbbi az agykéregben és a hippokampuszban található egyes fajtáit nevezik interneuronnak is. Megjegyzendő ugyanakkor, hogy egy neuron serkentő vagy gátló hatása függ a poszt-szinaptikus neuronon kifejeződő receptoroktól és a poszt-szinaptikus neuron fiziológiai állapotától is.

Ha a neuront ért inger nagysága meghalad egy küszöbértéket, a membránpotenciál ugrásszerűen 0 mV fölé emelkedik, majd ezt követően repolarizálódik, akciós potenciál keletkezik, ami az axonon terjed végig. Az idegsejtek axonjai leggyakrabban más idegsejtek dendritjein végződnek, szinapszist hozva létre. A szinapszisnak három fő része a preszinaptikus sejt, a szinaptikus rés és a poszt-szinaptikus sejt. Az akciós potenciál hatására a preszinaptikus sejt axon terminálisából ingerületátvivő anyagok, neurotranszmitterek szabadulnak fel. A két legfontosabb neurotranszmitter a serkentő ingerület átvitelért felelős glutaminsav és a gátló ingerület átvitelért felelős GABA. A két fő neurotranszmitter mellett számos más ingerületátvivő anyag is megtalálható az idegrendszerben, mint például az acetilkolin, dopamin, szerotonin, noradrenalin, szomatosztatin, P-anyag. A preszinaptikus idegsejtből felszabaduló neurotranszmitterek a szinaptikus résen át a poszt-szinaptikus sejt membránjához diffundálnak, ahol az ott található neurotranszmitter receptorokon kifejtik hatásukat. Ezt követően a neurotranszmitterek specifikus neurotranszmitter transzporterek segítségével vevődnek vissza a preszinaptikus idegsejtbe vagy a szinapszist körülvevő gliasejtbe.

A neuronok működését többfajta nem ingerlékeny sejt támogatja, amit összességében gliának neveznek. A főbb gliasejttípusok: 1) asztrociták, 2) oligodendrociták, 3) mikroglia. A glia elnevezés görög szó, melynek jelentése ragasztó. Ez az elnevezés utal arra, hogy a gliasejteket kezdetben a neuronokat összeragasztó tölteléksejteknek gondolták. Az utóbbi tízhúsz év kutatásai során fény derült rá, hogy lényegesen sokrétűbb funkciókkal rendelkeznek. Az oligodendrociták alakítják ki a neuronok axonjai körül a mielinhüvelyt, ami meggyorsítja az ingerület terjedését az axonon. A mikroglia az idegrendszer immunsejtje, míg az ependima sejtek az agyfolyadék képzésben és cirkuláltatásában vesznek részt (Johansson et al., 1999). Az asztrociták funkcióiról és az idegi aktivitásra gyakorolt hatásukról a következő fejezetben lesz részletesen szó.

## **1.2 Az asztrociták szerepe az idegi aktivitás modulálásában**

Az asztrociták nevüket a csillag alakban sűrűn elágazó nyúlványaikról kapták, amik nagy része körbeveszi a szinapszisokat. Az asztrociták két fő típusát különböztetik meg, a plazmás és a rostos asztrocitát. A plazmás asztrociták főként a szürkeállományban, míg a rostos asztrociták a fehérállományban találhatók meg.

Az asztrociták legfőbb funkciói a következők:

- 1) részt vesznek az agy struktúrájának kialakításában, ezen felül sérülés esetén az asztrociták töltik ki a sérült idegszövet helyét (Sun és Jakobs, 2012), illetve elősegítik a mielinhüvely képződést az axonokon az oligodendrociták működésének befolyásolásával (Ishibashi et al., 2006)
- 2) részt vesznek a vér-agy gát kialakításában (Verkhratsky et al., 2014),
- 3) befolyásolják az agyi vérerek működését és a véráramlást, közvetítik a neuronok aktivitását a kapillárisok felé (Stobart és Anderson, 2013)
- 4) glikogént raktároznak, amit laktáttá alakítanak és azzal támogatják a neuronok anyagcsere szükségletét intenzív működés esetén (Stobart és Anderson, 2013),
- 5) eltávolítják a neurotranszmittereket a szinaptikus részből (Coulter és Eid, 2012).  
Erre egy speciális példa a glutaminsav-glutamin ciklus. Ennek során az asztrociták a szinaptikus részből felveszik a neuronok által kibocsájtott glutaminsavat, majd azt a glutamin szintáz enzim átalakítja glutaminná, ami kibocsájtódik és a neuronok felveszik. A neuronok a felvett glutamint a glutamináz enzim segítségével ismét glutaminsavvá alakítják (Bak et al., 2006; Schousboe et al., 2013).



- 6) szabályozzák az extracelluláris tér ionösszetételét, különös tekintettel a kálium koncentrációjára (Wang et al., 2012)
- 7) befolyásolják a szinapszisok plaszticitását (Todd et al., 2006)
- 8) a gliotranszmisszió révén az asztrociták közvetlenül is modulálják a neuronok aktivitását (Santello et al., 2012).

Mint az a fentiekből látszik, az asztrociták igen sokféle funkciót látnak el a központi idegrendszerben. Ezek közül munkám során az asztrociták neurotranszmitter felvételének szerepét, azon belül is a glutaminsav felvételt és az extracelluláris tér ionösszetételének szabályozó funkcióját, azon belül is a kálium ionok felvételét vizsgáltam az agyi képződmények kialakításában.

A glutaminsav eltávolítása az extracelluláris térből azért különösen fontos, mert a glutaminsav magas koncentrációja toxikus az idegsejtekre (Dong et al., 2009). Fiziológiai körülmények között a glutaminsav koncentrációját szinte teljes mértékben az asztrociták szabályozzák (Schousboe és Waagepetersen, 2005; Stobart és Anderson, 2013). Az asztrociták nyúlványain, amik körbeveszik a glutamáterg szinapszisokat kifejeződik a két legfőbb glutaminsav transzporter, az 1-es a 2-es típusú serkentő aminosav transzporter (EAAT1 és EAAT2) (Danbolt, 2001). Ezek a transzporterek a glutaminsav koncentráció gradienssel ellentétes irányú transzportjához a nátriumionok és káliumionok elektrokémiai gradienst használják fel hajtóerőként (Diamond, 2005). A glutaminsav transzportja során 3  $\text{Na}^+$  és egy  $\text{H}^+$  transzportálódik a sejt belsejébe és ezzel párhuzamosan egy  $\text{K}^+$  távozik a sejtéből, tehát a folyamat elektrogén (Zerangue és Kavanaugh, 1996). Ez az asztrociták depolarizációjához vezet (Dallérac et al., 2013). A felvett glutaminsav egy része a glutaminsav-glutamin ciklusban hasznosul újra (Schousboe et al., 2013). Érdemes megjegyezni, hogy a glutaminsav transzporterek általában vizet is juttatnak a sejtbe (MacAulay et al., 2001), ezzel potenciálisan szerepük lehet a sejtduzzadásban is (Macaulay és Zeuthen, 2012).

A glutaminsav felvételén túl az asztrociták másik igen fontos funkciója az extracelluláris ionkoncentrációk, különösen a káliumionok koncentrációjának szabályozása. Az extracelluláris káliumion koncentráció a neuronális aktivitás következtében megnő (Hertz, 1966). A neuronok aktivitása a kálium klorid kotranszporter (KCC2) (Kahle et al., 2008), kálium csatornák (Maljevic és Lerche, 2013) és a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPáz (NKA) (Dobretsov és Stimers, 2005) működésén keresztül növelik meg az extracelluláris tér káliumkoncentrációját.

Azért van szükség a káliumionok eltávolítására az extracelluláris térből, mert a megnövekedett káliumion koncentráció hatással van az idegsejtek ingerlékenységére, extrém esetben epilepsziás rohamok keletkezhetnek (Balestrino et al., 1986; Kreisman és Smith, 1993).

Az asztrociták kétféleképpen szabályozzák az extracelluláris káliumion koncentrációját: 1) a káliumionok felvétele az extracelluláris térből (potassium clearance) (Walz, 2000), 2) az úgynevezett kálium pufferek (spatial buffering).

A kálium pufferek koncepciója Orkandtól származik (Orkand et al., 1966). Azon alapszik, hogy az asztrociták réskapcsolataik által egy funkcionálisan egybefüggő teret, szincitiumot képeznek (Scemes és Spray, 2012). A kálium pufferek során az aktív neuronok közelében lévő asztrociták felveszik a káliumionokat, ami a réskapcsolatokon keresztül az elektrotónikusan aktív régiótól távolabb terjed és ott visszakerül az extracelluláris térbe (Kofuji és Newman, 2004). A jelenség különlegessége az, hogy nem jár az asztrociták intracelluláris káliumkoncentrációjának növekedésével (Walz, 2000). A folyamat során a káliumionok felvételéért és leadásáért a  $K_{ir4.1}$  inward rectifier káliumcsatorna fő szerepét feltételezik (Butt és Kalsi, 2006). A  $K_{ir4.1}$  kálium konduktanciáját a kálium transzmembrán koncentráció gradiense határozza meg. Bár több kísérletes bizonyíték van a kálium pufferek létezésére és hozzájárulására a káliumkoncentráció szabályozásában (Chever et al., 2010; Haj-Yasein et al., 2011; Scemes és Spray, 2012), jelentőségét azonban többen vitatják (Meeks és Mennerick, 2007a; Macaulay és Zeuthen, 2012; Larsen et al., 2014).

A káliumionok aktív felvételében a legfontosabbnak tartott két fehérje az NKA és a  $Na^+/K^+/Cl^-$  kotranszporter (NKCC). Az NKA egy ATPáz aktivitással rendelkező antiporter, ami az ionok transzportjához az ATP hidrolíziséből felszabaduló energiát használja fel.  $\alpha$ ,  $\beta$ , és  $\gamma$  alegységekből épül fel. Az  $\alpha$  alegység felelős a katalitikus aktivitásért (Purhonen et al., 2006), a  $\beta$  alegység a fehérje foldingjáért és stabilitásáért felelős (Chow és Forte, 1995), míg a  $\gamma$  (FXD néven is ismert) alegység a fehérje aktivitásának mértékét szabályozza (Crambert és Geering, 2003). Az  $\alpha$  alegységnek négyféle izoformáját ismerjük, melyek közül az  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  kifejeződnek az idegsejteken és az asztrocitákon, míg az  $\alpha_3$  csak a neuronokra jellemző (McGrail et al., 1991; Brines és Robbins, 1993; Cholet et al., 2002). A  $\beta$  alegység négy izoformája ismert  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  és  $\beta_4$ , melyek közül  $\beta_2$  kifejeződése jellemző az asztrocitákra, míg a  $\beta_1$  izoforma mindkét sejt típusban előfordul (Li et al., 2013). Mivel a neuronokon kifejeződő NKA aktivitása már a nyugalmi káliumion-koncentráció mellett telített (Crambert et al., 2000), Larsen és munkatársai szerint az asztrocitákra specifikus  $\alpha_2/\beta_2$  NKA aktivitása lehet felelős a megnövekedett extracelluláris  $[K^+]$  lecsökkentéséért (Larsen et al., 2014). Az NKA működése során 3  $Na^+$  távozik a sejtéből és 2  $K^+$  transzportálódik a sejtbe (Walz et al., 1993; Walz és Wuttke, 1999).

Az NKCC két izoformája ismert az NKCC1 és NKCC2. Az NKCC1 általánosan kifejeződik a szövetekben, míg az NKCC2 kifejeződése a vesére jellemző (Haas, 1994). Az

NKCC1-nek kulcsszerepe van a GABAerg aktivitás szabályozásában (Kahle et al., 2009). Az NKCC1 nagy mértékben fejeződik ki érett asztrocitákon (Yan et al., 2001), működése során 1  $\text{Na}^+$ , 1  $\text{K}^+$  és 2  $\text{Cl}^-$  transzportál a sejtbe a koncentráció gradiensnek megfelelően, a transzportfolyamat elektroneutrális (Haas, 1994; Kahle et al., 2008). Emellett ismert, hogy vizet is transzportál a sejtbe, így potenciális szerepe van a sejtduzzadásban (MacAulay et al., 2004).

A fenti folyamatok nem függetlenek egymástól. Rose és munkatársai kimutattak a glutaminsav felvétel és az NKA működése között összefüggést (Rose et al., 2009), míg Djukic és munkatársai a  $\text{K}_{\text{ir4.1}}$  csatorna és a glutaminsav transzport közötti összefüggést mutattak ki (Djukic et al., 2007).

Mint a fentiekben látható, az asztrociták aktívan részt vesznek a neuronális aktivitás szabályozásában. A fent említett folyamatokon kívül az asztrociták a neuronális aktivitásra az intracelluláris kalcium koncentrációjuk megemelkedésével válaszolnak (Rusakov et al., 2011; Verkhratsky et al., 2012), melynek mérésével az asztrociták aktivitása fluoreszcensen detektálható.

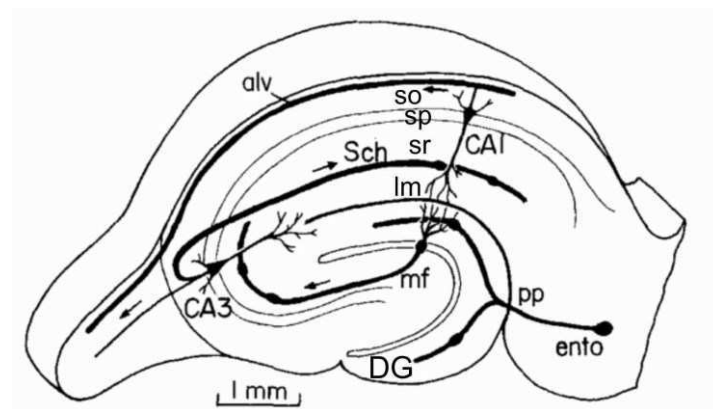
Összességében elmondható, hogy az asztrociták nagymértékben befolyásolják az idegi aktivitást az extracelluláris neurotranszmitter és  $\text{K}^+$  koncentráció szabályozásával.

### **1.3 A hippocampusz anatómiai és fiziológiai jellemzői**

A hippocampusz az egyik legszélesebb körben vizsgált agyterület, nevét az emberi hippocampusz csikóhalhoz hasonlító alakja miatt kapta. A neuroanatómiai fogalmak tisztázása okán, hippocampusz alatt a hippocampusz proper értjük, ami a hippocampális formáció része. A hippocampális formáció a következő részeket foglalja magában: 1) a hippocampusz proper (CA- cornu Ammonis vagy Ammon-szarv), mely a citoarchitektúrában való különbségek alapján három alrégióra, a CA1, CA2 és a CA3-ra osztható, 2) gyrus dentatus, 3) szubikulum, 4) preszubikulum, 5) paraszubikulum és 6) entorhinális kéreg. A hippocampusz a limbikus rendszer része, igen fontos szerepet tölt be a memória képződésében, sérülése anterográdn amnéziát okoz (Scoville és Milner, 1957). A memória képződésén túl rendkívül fontos szerepet játszik a térbeli tájékozódásban és tanulásban (Moser és Moser, 1998). A hippocampusz sejtrétegei a következők: 1) stratum pyramidale, itt található a fő serkentő neuron típus, a piramis sejtek sejtteste, amik apikális dendritfája a 2) stratum radiatum-ban és a 3) lacunosum-moleculareban, míg bazális dendritjei a 4) stratum oriensben találhatók meg. A piramis sejtek axonjai az 5) alveusnak nevezett rétegben hagyják el a hippocampuszt. A piramis sejtek mellett a hippocampusz számos GABAerg interneuron típust tartalmaz. A fő interneuron típus az

úgynevezett kosársejt, ami a piramis sejtek sejttesteivel vagy apikális dendritjeivel szinaptizál (Freund és Buzsáki, 1996).

A hippocampusz kapcsolati rendszere triszinaptikus pályaként ismert (Andersen et al., 1971b) (1. ábra). Az entorhinális kéreg II. rétegében található piramis sejtek axonjai alkotják a perforáns pályát, ami többek között a gyrus dentatus szemcsesejtjeinek dendritjein végződik. A gyrus dentatus szemesejtjeinek axonjai, az úgynevezett moharostok a hippocampusz CA3 régió piramis sejtjeire vetítenek. A CA3 piramis sejtjei axonjainak kollaterálisai az úgynevezett Schaffer kollaterálisokba szedődnek össze, és a CA1 piramis sejtjei apikális és bazális dendritjein végződnek. A CA1 piramis sejtjei axonjai az alveusban szedődnek össze és a szubikulumon át visszavetítenek az entorhinális kéreg mélyebb rétegeibe. Meg kell jegyezni, hogy a fent említett pályákon kívül, a piramis sejtjei axonjainak kollaterálisai beidegzik a szomszédos piramis sejtjeiket létrehozva az úgynevezett asszociációs pályákat (Andersen et al., 2007).



**1. ábra: A hippocampusz keresztmetszeti képe.** Alv: alveus, Sch: Schaffer kollaterális, mf: moharostok, pp: perforáns pálya, lm: lacunosum-moleculare, sr: stratum radiatum, sp: stratum pyramidale, so: stratum oriens, DG: gyrus dentatus, ento: entorhinális kéreg. Andersen és munkatársai 1971-es cikkéből (Andersen et al., 1971a).

## 1.4 Agyi aktivitás térbeli mérésére alkalmas módszerek

Az idegi aktivitás térbeli és időbeli detektálására alapvetően kétféle módszert alkalmaznak: az elektrofiziológiai és az optikai detektálást. A következő alfejezetekben ezeket a módszereket tekintem át.

### 1.4.1 Mezőpotenciál, hippocampuszban mért mezőpotenciál jelek

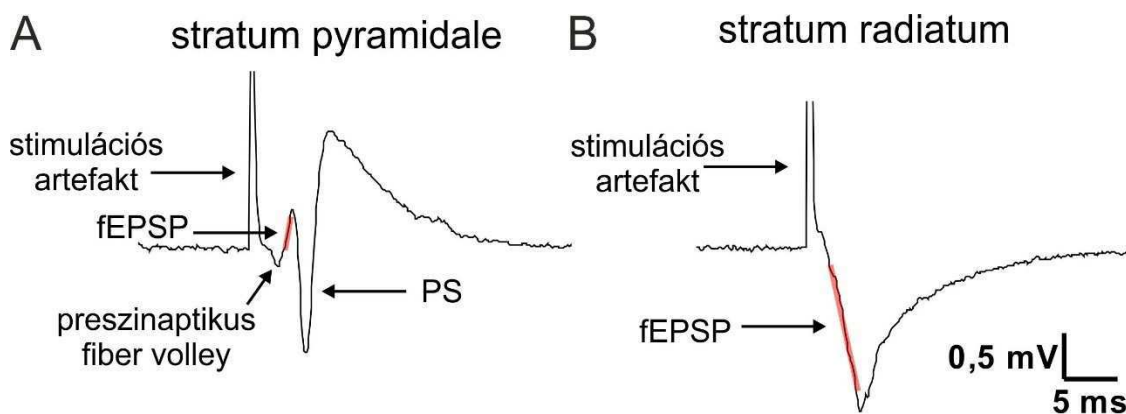
Elektrofiziológiai módszerrel mért, az idegi aktivitás térbeli követésére gyakran használt jel a mezőpotenciál. Mezőpotenciál alatt jelen dolgozatban az úgynevezett lokális mezőpotenciált értem (LFP – local field potential). A szövet egy pontjában mért összes aktív folyamat által generált, összes elektromos áram szuperponálásával jön létre egy bizonyos

potenciál egy referenciához képest (Buzsáki et al., 2012). Leegyszerűsítve a mezőpotenciál az elektród közelében lévő sejtek aktivitásának eredőjét méri. Mivel az összes elektromosan aktív folyamat részt vesz a mezőpotenciál kialakításában ezért a neuronok tüzelése, a szinaptikus áramok, a kalcium tüskék, az efaptikus folyamatok és a gliasejtek aktivitása is hozzájárul a mezőpotenciál kialakításához (Buzsáki et al., 2012). Ezen folyamatok hozzájárulásának aránya a mezőpotenciál jelhez a mai napig nem teljesen tisztázott, különösen keveset lehet tudni a gliasejtek hozzájárulásáról. In vivo kutatások kimutatták az asztrociták hozzájárulását a lassú ( $\sim 1$  Hz) oszcillációkhoz (Vanhatalo et al., 2004; Poskanzer és Yuste, 2011).

Az sem tisztázott, hogy mekkora az elektródtól különböző távolságban lévő sejtek hozzájárulása a mezőpotenciálhoz. A korábbi eredményekkel ellentétében, melyek szerint a lokális mezőpotenciál a környező 200-400  $\mu\text{m}$  távolságban lévő sejtek aktivitását mutatja (Katzner et al., 2009; Xing et al., 2009), Kajikawa és Schroeder megmutatták, hogy akár 6 mm-nél nagyobb távolságban lévő aktivitás is hozzájárulhat a lokális mezőpotenciálhoz (Kajikawa és Schroeder, 2011).

Legtöbb esetben technikai okok miatt egy vagy néhány mezőpotenciál mérőelektródot használnak a mérésekhez (Colgin et al., 2004). Mivel néhány elektróddal csak igen limitált információ nyerhető a térbeli idegi aktivitásról, ezért alkalmaznak úgynevezett mátrixelektródokat (MEA multielectrode array). Ezek 2 dimenziós elrendezésű elektród mátrixok, amik lehetővé teszik, hogy akár több ezer elektróddal (Berdondini et al., 2009), nagy időbeli felbontással kövessük a neuronális aktivitást (Franke et al., 2012). A mátrixelektródok fontos paramétere az elektródok közötti távolság. A nagy sűrűségű mátrixelektródoknál az elektródok közötti távolság 20  $\mu\text{m}$  alatt van, de a piaci forgalomban lévő mátrixelektródok többségénél az elektródok közötti távolság 60-200  $\mu\text{m}$  (Franke et al., 2012).

A kiváltott mezőpotenciál jel vagy röviden kiváltott válasz egy sejtcsoport szinkron aktivitásából jön létre, elektromos ingerlés vagy szenzoros bemenet aktivitásának hatására. A hippokampuszban az egyik leggyakrabban mért jel a Schaffer kollaterálisok ingerlésével kiváltott válasz. A mérés során a mérőelektródot legtöbbször a CA1 stratum radiatum vagy stratum pyramidale régiójában helyezik el.



**2. ábra: A hippocampusz CA1 régiójában mért mezőpotenciál jel komponensei.** A CA1 stratum pyramidaleban (A) míg a jobb oldalon a stratum radiatumban (B) mért Schaffer kollaterális ingerléssel kiváltott mezőpotenciál jel, az úgynevezett kiváltott válasz látható. A kiváltott válasz komponenseit nyilak mutatják, a jelen látható átlátszó piros görbeszakasz mutatja azt az egyenest, melyből az fEPSP meredeksége számolható. fEPSP – field excitatory postsynaptic potential, mező posztszinaptikus potenciál, PS – population spike, populációs tüske.

A 2. ábra mutatja a kiváltott válasz komponenseit. A jel első komponense az úgynevezett presynaptic fiber volley, ami a preszinaptikus neuronok axonjain terjedő ingerületet jelzi. Az ingerlés hatására aktiválódott szinaptikus áramok összessége negatív kitérésként mérhető a stratum radiatumban ezt nevezik mező posztszinaptikus potenciálnak (fEPSP – field excitatory postsynaptic potential) is, ugyanez az aktivitás a piramis rétegben pozitív kitérésként mérhető, mivel a sejtesteknél extracellulárisan záródik az áramkör (Andersen et al., 2007). Ha az ingerlés mértéke meghaladja a neuronok tüzelési küszöbét, akkor a piramis rétegben megjelenik nagy éles negatív kitérésként a populációs tüske (PS – population spike). A populációs tüske megfeleltethető a szomszédos idegsejtek szinkron tüzelésének (Andersen et al., 1971a), míg a mező posztszinaptikus potenciál meredeksége a posztszinaptikus aktivitás mértékét, a piramis sejtekre érkező bemenet erősségét jelzi (Andersen et al., 1966). A továbbiakban mezőpotenciál jel alatt a kiváltott választ értem.

Összefoglalva a mezőpotenciál mérés nagy előnye, hogy igen nagy időbeli felbontással ( $<0,1$  ms) mérhető (Liu et al., 2012), így részletes képet kaphatunk az adott területre érkező bemenet nagyságáról és a neuronok tüzelésének mértékéről. A módszer hátránya viszont, hogy a távoli sejtek hozzájárulása és elektródok közötti véges távolság miatt a térbeli felbontása erősen limitált. Emellett az elektródoknak érintkeznie kell a szövetrel, ezért ez a módszer invazív.

A térbeli felbontás növelése érdekében az idegi aktivitás optikai módszerekkel, mint például feszültségfüggő festékekkel vagy a belső optikai jel detektálásával követhető.

### 1.4.2 Feszültségfüggő festék képalkotás

A feszültségfüggő festék (VSD – voltage-sensitive dye) képalkotás egy igen hatékony technika az idegi aktivitás térképezésére. VSD képalkotással a sejtmembránban bekövetkező feszültségváltozások követhetők nyomon nagy térbeli (Tsytsarev et al., 2010) és időbeli felbontással (Chemla és Chavane, 2010). A teljesség igénye nélkül jelenleg a következő festékeket, illetve módszereket használják a membránpotenciál mérésére idegszövetben (Peterka et al., 2011):

- szerves kromofórok (VSD-k), amiket a legkorábban kezdtek el használni és talán ezek terjedtek el a legjobban. A szerves VSD-k többsége tartalmaz egy pár lipofil szénhidrogén láncot, ami a sejtmembránhoz köti, míg a molekula többi része hidrofíl. Jellemzően fluoreszcencia intenzitás vagy abszorbancia változással reagálnak a transzmembrán feszültség változására (Ebner és Chen, 1995);
- genetikai indikátorok, ezek többségében a GFP (green fluorescent protein – zöld fluoreszcens fehérje) módosított változatai (Baker et al., 2007; Villalba-Galea et al., 2009; Akemann et al., 2010, 2012);
- hibrid feszültségindikátorok. a genetikai indikátorok és a szerves VSD festékek hibridjei, általában fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) alapú rendszerek (González és Tsien, 1995);
- másodharmónikus generálás (SHG - second harmonic generation) alapú detektáló módszerek (Jiang et al., 2007);
- nanokristályok vagy kvantum dotok (Peleg et al., 1999).

A szerves VSD-k nagy előnye a MEA-val szemben a nagyobb térbeli felbontás, az egyszerű alkalmazhatóság, kisebb invazivitás, valamint a gyorsabb kinetika. Ugyanakkor a VSD-k hátrányai, hogy nem sejtspecifikusak, megváltoztathatják a membrán elektromos tulajdonságait, fototoxikusak lehetnek, farmakológiai mellékhatásaik lehetnek a membránfehérjéken, valamint, hogy a legtöbb esetben alacsony a jel/zaj arányuk. A genetikai és a hibrid feszültség indikátorok a sejtspecifikusság problémáját kiküszöbölik, de mindezt a sebesség rovására teszik. A másodharmónikus generáláson alapuló képalkotás a fototoxicitást kiküszöböli ki, de ugyanakkor további technikai problémákat vet fel. A kvantum dotok szintén toxikusan lehetnek a szövetre, illetve viszonylag nagy méretük miatt a célba juttatásuk is problematikus lehet.

Mivel kísérleteim során szerves VSD-t használtam ezek működési mechanizmusáról és típusairól lesz szó részletesebben. Az egyik legegyszerűbb feszültségérzékelő mechanizmus a

festék sejten belüli eloszlásának változása a feszültség függvényében (Ehrenberg et al., 1988). Ennek a folyamatnak a következtében a fluoreszcencia intenzitása vagy az abszorbancia mértéke megváltozik. Ezeket a festékeket Nernstianus vagy lassú festékeknek is nevezik, mert az eloszlásuk a Nernst egyenletben leírt dinamikát követi, ami a többi mechanizmushoz képest egy lassú egyensúlyi folyamat. Ezek a festékek kémiai szempontból negatív töltésű oxonol, merocianin vagy karbocianin típusú vegyületek. Egy példa a lassú festékekre a forgalomban kapható vegyületek közül az Oxonol V (Majander és Wikström, 1989) és a Rhodamin 123 (R123). Az R123 festéket használják a mitokondrium membránpotenciáljának nyomon követésére. Kontroll körülmények között az R123 festék bejut a mitokondriumba és az önkkioltás miatt a fluoreszcencia intenzitás alacsony. Ha a mitokondrium depolarizálódik a festék kikerül a mitokondriumból és a fluoreszcencia intenzitás megnő (Nicholls, 2006; Kann és Kovács, 2007; Nyitrai et al., 2013).

Az előbb leírtakhoz képest jóval gyorsabbak a reorientáció és az elektrokromizmus mechanizmusok. A reorientáció során a VSD molekula feszültségváltozás hatására való membránon belüli mozgása, illetve orientációjának változása okozza az abszorbancia vagy fluoreszcencia intenzitásbeli változásokat. Az elektrokromizmus során a külső elektromos tér változásának hatására a molekulán belüli mozgások vezetnek az optikai tulajdonságokban bekövetkező változásokhoz. (Ebner és Chen, 1995; Peterka et al., 2011). A reorientáció és az elektrokromizmus mechanizmusával működő VSD-ket nevezik gyors VSD-nek is, ezek kémiaiilag 4 fő csoportot alkotnak: 1) merocianine-oxazon 2) merocianin-rhodanin 3) oxonol és 4) sztril festékek. Ezek a molekulák többnyire amfipatikusak, az abszorbancia vagy fluoreszcencia intenzitás változásuk lineáris összefüggést mutat a feszültség változásával. Az elektrokromizmus a sztril és hemicianin festékekre, míg a reorientáció az oxonol festékekre jellemző. Napjainkra legelterjedtebben az oxonol és a sztril festékeket használják, előbbire példa az NK3630 (RH 482) és az NK3041 (RH 155), melyek abszorbancia festékek, utóbbira példa az RH795, RH414 és a Di-4-ANEPPS és változatai, amik fluoreszcensek.

Kísérleteim során az NK3630 festéket alkalmaztam az idegi aktivitás változásának követésére. Választásomnak a következő okai voltak: 1) gyorsan reagál a feszültség változásokra ( $< 1$  ms), 2) ennek a festéknek in vitro nem mutattak ki fototoxikus hatását (Chang és Jackson, 2003), 3) farmakológia mellékhatása nem ismert, 4) akár hosszú távú mérésre is alkalmas (Jin et al., 2002), 5) szeletpreparátumban előnyösebb abszorbancia festéket használni az optimális jel-zaj arány elérése érdekében (Grinvald et al., 1999), 5) a fotodióda mátrix detektor elsősorban nagy jeleken bekövetkező kis változások mérésére alkalmas, így célszerű abszorbancia típusú festékeket alkalmazni.



Az NK3630 feszültségfüggő festék egyaránt megfesti a neuronokat és a gliasejteket (Konnerth et al., 1987; Kojima et al., 1999), a festék által detektált jelben számottevő a gliális membránpotenciál-változások hozzájárulása (Konnerth et al., 1987; Kojima et al., 1999; Chen és Sokabe, 2005). Kojima és munkatársai az NK3630 és NK3041 festék jelében megkülönböztetnek egy gyors ( $\sim < 10$  ms) és egy lassú választ ( $\sim > 10$  ms). A lassú válasz nagy részét a gliális glutaminsav felvétel következtében létrejövő asztrocita depolarizációnak tulajdonítják (Kojima et al., 1999). Konnerth és munkatársai viszont ugyanezt a lassú komponenst az asztrociták kálium felvételével asszociálják (Konnerth et al., 1987).

### **1.4.3 Belső optikai jel (Intrinsic Optical Signal - IOS) képkalkotás**

Az IOS képkalkotás során a sejtek saját optikai tulajdonságaiban bekövetkező változásokat, mint például a fényszórás változást, a szövetben lévő kromofórok optikai tulajdonságainak változását és az optikai dikroizmust (Cohen, 1973) követjük nyomon.

Az IOS képkalkotás legnagyobb előnye a fent említett membránpotenciál detektálási módszerekkel szemben, hogy jelölésmentes (MacVicar és Hochman, 1991; Rector et al., 1997; Mc Loughlin és Blasdel, 1998; Zepeda et al., 2004; Chen-Bee et al., 2010). A jelölésmentességnek köszönhetően az IOS képkalkotásnak nagy potenciálja van a diagnosztikában, például idegsebészeti beavatkozások során az epilepsziás góc lokalizálásában (Haglund és Hochman, 2004; Prakash et al., 2009; Haglund, 2012). Az infravörös vagy ahhoz közeli megvilágító fénnel (750-1000 nm) való IOS képkalkotás révén akár az intakt koponyán keresztül is lehet mérni az agykéreg felszíni idegi aktivitást (Liu et al., 2014). Az idegsebészeti potenciálja ellenére az IOS képkalkotás során detektált jel sejtes és molekuláris komponensei a mai napig nem teljesen tisztázottak (Kawauchi et al., 2009).

Az IOS képkalkotást in vivo leggyakrabban a szenzoros agykérgi aktivitás térképezésére használják (Masino és Frostig, 1996; Gurden et al., 2006; Luo et al., 2007; Kremer et al., 2011). In vivo az IOS egy többkomponensű jel, az egyes komponensek hozzájárulása a jelhez pedig a megvilágítási hullámhossztól függ (Zepeda et al., 2004): 1) a vértérfogat változása (570 nm, (Frostig et al., 1990)), 2) hemoglobin oxigenációjának változása (600-630 nm (Frostig et al., 1990)), valamint a sejtben lévő citokrómok elnyelésének/emissziójának változása (440-650 (Narayan et al., 1994a), 3) fényszórás változás ( $> 650$  nm (Narayan et al., 1994a, 1994b; Mc Loughlin és Blasdel, 1998)). Mivel ez egy nem invazív, és gyengédebb módszer, mint az EEG technika, alkalmazzák újszülöttek agyi aktivitásának térképezésére is (Liu et al., 2014). Érdeemes megemlíteni, hogy a funkcionális mágneses rezonancián alapuló képkalkotás (fMRI – functional magnetic resonance imaging) vér oxigenációs szignálja (BOLD – blood-oxygen-

level dependent contrast imaging) is a hemoglobin oxigenációjának mértékén és a véráramlás változásán alapul (Cannestra et al., 2004).

Az in vitro izolált agyszeletekben mért IOS-ról feltételezik, hogy szinte kizárólagos forrásai a fényelnyelésben és a fényszórásban bekövetkező változások (Aitken et al., 1999; Fayuk et al., 2002). A fényelnyelésben bekövetkező változások nagy részét a szövetben lévő citokrómok, mint például a mitokondriumban lévő porfirinek és a szövetben maradó hemoglobin okozzák (Haglund et al., 2008). A neurális aktivitást kiváltó stimulus alapján az IOS az alábbi típusokra osztható:

- az excitotoxicitás okozta IOS, ahol a fényszórás változást a dendritek szerkezetében bekövetkező változások okozzák (Jarvis et al., 1999)
- „kúszó gátlás” vagy „utazó hullám” (spreading depression) esetében a fényszórás változást valószínűleg a mitokondrium szerkezetében bekövetkező változások és a metabolikus aktivitás változása okozhatja (Aitken et al., 1999; Fayuk et al., 2002; Mané és Müller, 2012)
- az ozmotikus nyomás változtatásával vagy az afferensek elektromos stimulálásával kiváltott IOS-nál, a fényszórás változást a sejtek duzzadása (Federico et al., 1994; Aitken et al., 1999), illetve az extracelluláris tér térfogatának megváltozása okozza (Holthoff és Witte, 1996, 1998).

Mindhárom szignálnak vannak patofiziológiai vonatkozásai. Az excitotoxicitás okozta jelet az epilepsziával (Mehta et al., 2013) és a szélütéssel (stroke) (Lai et al., 2014), az utazó hullám megjelenését a migrénnel asszociálják (Mainero és Louapre, 2014), míg a sejtduzzadásnak szerepe van az ödéma (Liang et al., 2007) kialakulásában. Mivel kísérleteim során az afferens ingerléssel kiváltott IOS-t vizsgáltam ezért részletesebben erről lesz szó.

Az afferens ingerléssel kiváltott IOS kialakításában részt vevő mechanizmusokat in vitro több különböző agyszelet preparátumon tanulmányozták (Dodt és Zieglängsberger, 1998; Aitken et al., 1999; Cerne és Haglund, 2002; Syková et al., 2003). Az afferens ingerléssel kiváltott IOS (a továbbiakban IOS) hippocampusz (MacVicar és Hochman, 1991) és neocortex agyszeleteken (Kohn et al., 2000; Cerne és Haglund, 2002) függött a poszt-szinaptikus aktivitástól. Neocortex szeleteken kimutatták, hogy az IOS a serkentő poszt-szinaptikus aktivitást mutatja, és azon belül is jobban korrelált a küszöbalatti serkentő aktivitással, mint a neuronok tüzelésével (Dodt et al., 1996; Cerne és Haglund, 2002), de a különböző serkentő neurotranszmitter receptorok hozzájárulásnak mértéke az optikai jelhez még mindig nem tisztázott.

A feltételezés, hogy az IOS a neuronális aktivitás kiváltotta sejtduzzadással korrelál azon alapul, hogy az afferens stimulálással kiváltott in vitro IOS gátolható volt a klorid homeosztázisban kulcsszerepet játszó transzporterek nem specifikus gátlószerének, a furoszemidnek alkalmazásával, valamint az extracelluláris klorid koncentráció radikális lecsökkentésével (MacVicar és Hochman, 1991; Holthoff és Witte, 1996). Feltételezték, hogy az IOS főképp a KCl felvétel okozta asztrogliális sejtduzzadást mutatja, ami a furoszemidre érzékeny NKCC1 kotranszpoteren keresztül valósul meg (MacVicar és Hochman, 1991; Holthoff és Witte, 1996; Macvicar et al., 2002). A sejtduzzadásban szerepet játszó egyéb fehérjék, mint például a térfogat-szabályozott anion csatornák (VRAC – volume-regulated anion channel) (Eggermont et al., 2001; Qiu et al., 2014), vagy akár a gliális glutaminsav transzporterek (Schneider et al., 1992; Han et al., 2004) szerepét az IOS kialakításában azonban mindezidáig részletesen nem vizsgálták meg. Szintén ismeretlen az asztrociták kálium felvételében részt vevő NKA és  $K_{ir4.1}$  szerepe is az IOS kialakításában.

## 2 CÉLKITŰZÉSEK

Munkám fő célja az volt, hogy vizsgáljam az IOS és a VSD jel háttérében meghúzódó sejtes és molekuláris mechanizmusokat, illetve, hogy a két optikai szignál és a mezőpotenciál jel összehasonlításával pontosabb képet kapjak arról, milyen folyamatok kapcsolják össze az idegi aktivitást az optikai jelekkel. Erre a célra in vitro hippokampusz agyszelet preparátumot használtam, amiben az optikai jelek és a mezőpotenciál jel kiváltásához elektromos ingerlést alkalmaztam. Az optikai jelek háttérében álló molekuláris mechanizmusok vizsgálatára farmakológiai megközelítést használtam. Munkám során a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Milyen viszonyban van a gyors képképzéssel detektált IOS jel az irodalomban dokumentálttal? Milyen fajta (posztszinaptikus vagy preszinaptikus) idegi aktivitást követnek az optikai jelek?
2. Milyen az optikai jelek térbeli eloszlása és időbeli lefutása? Milyen a terjedési sebességük és mintázatuk a mezőpotenciál terjedési sebességéhez viszonyítva? Megkülönböztethetők-e a különböző módon aktiválódott régiók egymástól az optikai jelek alapján?
3. Feltételezik, hogy az IOS főképp a KCl felvétel okozta asztroglialis sejtduzzadást mutatja, illetve a VSD jelben is szerepet játszhat az asztroglia sejtek glutaminsav és  $K^+$  felvétele. Felmerül a kérdés, hogy milyen mértékben járulnak hozzá az optikai jelekhez azok a fehérjék, amik szerepet játszanak a sejtduzzadásban és a kálium ionok felvételében, mint például az asztroglialis glutaminsav transzporter (EAAT2), a NKCC1, a  $K_{ir4.1}$ , az NKA és az anion csatornák?

### **3 KÍSÉRLETI MÓDSZEREK**

#### **3.1 Felhasznált anyagok**

A mérések során az oldatokhoz felhasznált sók a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) és a Reanal (Budapest, Magyarország) cégektől származtak. A picrotoxint, a DIDS-et, NPPB-t, a bárium kloridot és a furoszemidet szintén a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) cégtől szereztük be, míg a TTX, DHK, MRS2179, ouabain és a bumetanid a Tocris Biochemicals (Bristol, Nagy-Britannia) származtak. A CNQX és az APV vegyületeket az Abcam Biochemicals (Cambridge, Nagy-Britannia) cégtől vásároltuk.

#### **3.2 Túlélő agyszelet preparálás**

A szimultán mezőpotenciál és képalkotás mérésekhez 21-50 napos fiatal hím Wistar patkányokat használtam (Toxicoop Kft., Budapest, Magyarország). Az egysejtaktivitás mérések fiatalabb, 11-20 napos állatokban történtek. A felhasznált állatokat a Magyar Állattartási Törvénynek (1998) és az Európai Bizottság 1986. november 24-i rendeletének (86/609/EEC) megfelelően tartottam és kezeltem.

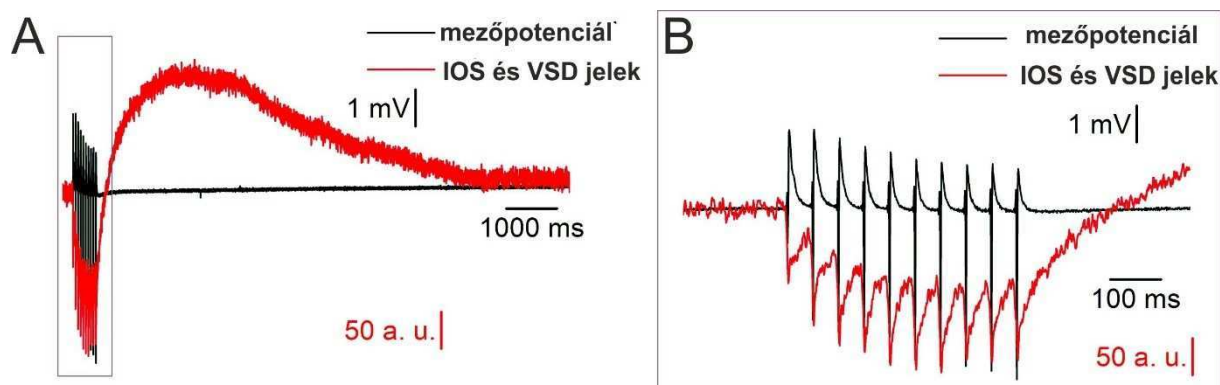
A patkányokat dekapitáltam, az agyat gyors mozdulatokkal kiemelttem és jéghideg, karbogénnel (95% O<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub>) buborékolatott, magas cukortartalmú pufferben (87 mM NaCl, 25 mM glükóz, 75 mM szacharóz, 2,5 mM KCl, 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 mM MgSO<sub>4</sub>, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH = 7,4) vibratóm segítségével (Leica VT1000S, Leica Microsystems, Wetzlar, Németország) 400 µm vastagságú, horizontális hippokampusz-entorhinális kéreg szeleteket vágtam. A szeleteket egy karbogénnel buborékolatott mesterséges agyfolyadék (ACSF- artificial cerebrospinal fluid) tartalmú interface típusú kamrában inkubáltam szobahőmérsékleten a mérés megkezdéséig. Az ACSF összetétele mM-ban megadva: 129 NaCl, 10 glükóz, 3 KCl, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 MgSO<sub>4</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 21 NaHCO<sub>3</sub>. A mérést egy karbogénnel telített ACSF-fel átáramoltatott (3-4 ml/perc) submerged típusú kamrában végeztem, amelyet 37 °C-ra fűtöttem.

#### **3.3 Elektromos stimulálás és az elektrofiziológiai jelek regisztrálása**

A stimuláló elektródot a Schaffer kollaterálisok köré, a CA3 régió stratum radiatum rétegébe helyeztem, a mezőpotenciál jeleket, ha másképp nem jeleztem, akkor a CA1 régió piramis rétegéből mértem. Az ingerléshez bipoláris volfrám stimuláló elektródot használtam (75 µm átmérőjű, Microprobes for Life Science), melyen keresztül 0,2 ms időtartamú négyszög feszültség ingerekkel ingereltem az idegsejteket. Az ingerlés erősségét (40-50V) úgy határoztam meg, hogy fele akkora jelet kapjak, mint a maximális amplitúdójú mezőpotenciál

jel. Az IOS és a VSD jel, valamint egysejtaktivitás méréséhez különböző ingerlési protokollokat használtam. Az IOS jel kiváltásához 20 Hz-es 10 darab stimulusból álló ingersorozatot használtam, míg a VSD és az egysejtaktivitás méréseknél csak egyetlen stimulust alkalmaztam. Az egysejtaktivitás mérésnél azért jártam el így, hogy a mért sejtnél a lehető legkevesebb kárt okozzam. A VSD jel és az IOS esetében azért használtam különböző ingerlési protokollt, mert a két jel spektrálisan átfed és csak így tudtam biztonsággal elkülöníteni a két jelet. Az IOS nagysága elhanyagolható, ha csak egyetlen stimulust kap a szelet, ezért egyetlen stimulus alkalmazásánál csak VSD jelet lehet detektálni a festett szeletből. A VSD jel az ingersorozat alatt pedig azért nem detektálható megbízhatóan, mert egyrészt átfed az ellenkező előjelű IOS jellel, másrészt a VSD jel hosszabb, mint a stimulusok közötti időintervallum, ezért az ingersorozat alatt az egyes VSD jelek amplitúdója összegződik (ez látható a 3. ábrán).

Minden egyes stimulust egy 200 ms hosszú késleltetés előzött meg, ezt a szakaszt használtam az alapvonal számításához. Az IOS esetén 10 percenként 3-szor, a VSD jel esetén 10 percenként 5-szor, míg az egysejtaktivitás méréseknél 5 percenként 1-szer ingereltem a szeletet.



**3. ábra: Az egyszerre detektált mezőpotenciál, IOS és VSD jelek egymáshoz való viszonya.** Az ábrán a piros görbén az IOS a pozitív irányú, míg a VSD jel negatív irányú kitérésként látható. Az ábra A részén látható görbe kezdeti szakaszának nagyításán (B) látszik, hogy a VSD jel az ingersorozat alatt a kiváltott válasszal ellentétben nem tér vissza az alapvonalra.

Az elektrofiziológiai mérések során használt mérőelektródokat boroszilikát kapillárisokból húztam (DMZ pipetta húzó, Zeitz – Instruments, Martinsried, Németország). A mezőpotenciál (2–5 MΩ) és a cell-attached (5–9 MΩ) mérésekre használt elektródokat ACSF-fel töltöttem fel, és a tartófeszültséget 0 mV-ra állítottam. A whole-cell patch clamp méréseknél (3–5 MΩ) a pipettákat a következő oldattal töltöttem meg: 135 mM kálium glükonát, 10 mM NaCl, 0,05 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM adenosine-5'-trifoszfát (ATP; Mg<sup>2+</sup> salt), 10 mM 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinétáneszulfonsav (HEPES), 3 mM etilén-glikol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA). Az oldat pH-ját 7,3-ra állítottam be (Lasztóczy et al., 2009).

Az egysejtaktivitást mérő pipetták hegyét a mezőpotenciált mérő elektród 100  $\mu\text{m}$ -es körzetébe helyeztem.

A mérésekhez kétcsatornás Multiclamp 700A erősítőt használtam (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). A jeleket 2 kHz-es alul áteresztő szűrővel szűrtem és 10 kHz-en digitalizáltam Digidata 1320A analóg/digitális konverter (Axon Instruments, Foster City, CA) segítségével. A mérésekhez és adattároláshoz a pClamp8 (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) programot használtam.

### **3.4 Festési protokollok**

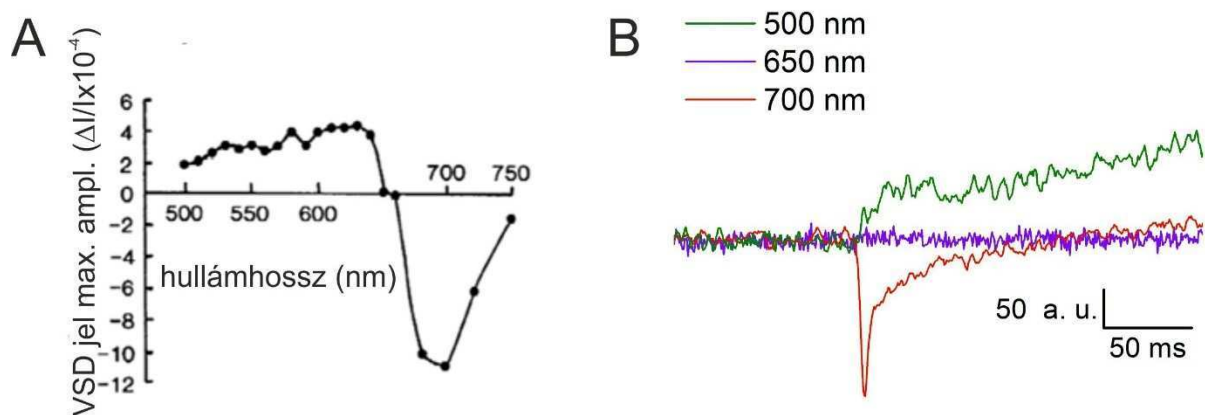
A VSD jel képkalkotásnál a szeleteket 10 percig, sötétben festettem szobahőmérsékleten 0,3 mg/ml (307  $\mu\text{M}$ ) NK3630 (RH482, Hayashibara Biochemical Laboratories, Okayama, Japan) feszültségfüggő festéket tartalmazó, karbogénnel buborékolgatott 1 ml ACSF-ben (Momose-Sato et al., 1999; Chang és Jackson, 2003). A szeleteket a festés követően 3x1 ml ACSF-fel mostam és a felhasználás előtt legalább egy órán át sötétben tartottam.

A kalcium szignálok detektálásához hasonlóan festettem a szeleteket, annyi különbséggel, hogy a festőoldat végkoncentrációi az ACSF-ben: 5  $\mu\text{M}$  Fluo-4 AM (Invitrogen), 0,2 v/v % DMSO, 0,04 v/v % Pluronic-127 (Molecular Probes), a festési hőmérséklet pedig 35  $^{\circ}\text{C}$  volt. A szeleteket a festés követően 3x1 ml ACSF-fel mostam és a felhasználás előtt legalább fél órán át sötétben tartottam (Molnár et al., 2011a).

A mitokondrium membránpotenciáljának detektálásához 15  $\mu\text{g/ml}$  rhodamin 123-at (R123, Life Technologies) tartalmazó buborékolgatott ACSF-ben, sötétben, szobahőmérsékleten, 20 percig festettem a szeleteket. A szeleteket a festés követően 3x1 ml ACSF-fel mostam és a felhasználás előtt legalább fél órán át sötétben tartottam (Kovács et al., 2005).

### **3.5 Képkalkotási módszerek**

Az IOS és a VSD jelek esetében a szeleteket halogén lámpával (100 W) világítottam meg egy sáváteresztő szűrőn keresztül (700 $\pm$ 40 nm, Chroma Technology, Rockingham, VT). A VSD jel validálásánál használtam 500 $\pm$ 40 nm, (Chroma Technology, Rockingham, VT) és 650 $\pm$ 3 nm, (Knight Optical (UK) Ltd, Harrietsham) sáváteresztő szűrőket is. Mint ahogy azt Momose-Sato és munkatársai mérései alapján (Momose-Sato et al., 1999) vártam 500 nm-nél kis pozitív amplitúdójú jel volt mérhető, 650 nm-nél nem detektáltam VSD jelet, míg a legnagyobb negatív kitérésű jel 700 nm-en volt detektálható (4. ábra).



**4. ábra: A VSD jel validálása.** **A:** az NK3630 festék jele és a megvilágító fény hullámhossza közötti összefüggés látható (módosítva Momose-Sato és munkatársai cikkéből (Momose-Sato et al., 1999)). **B:** az általam detektált, Schaffer kollaterális ingerléssel kiváltott (50V) VSD jelek láthatóak, különböző hullámhosszú megvilágítással (500, 650, 700nm) detektálva. A jelek CA1 piramis rétegből, a mezőpotenciál elektród közelében lévő fotodiódáról származnak.

A szelet által áteresztett fény intenzitásának változását (transzmittancia, T) egy 464 elemű fotodióda mátrix detektorral (Wutech H-469IV photodiode array (PDA), Redshirtimaging LLC, Decatur, USA) mértem. Az általam használt fotodióda mátrix detektor a Neuroplex nevű képalkotó rendszer része (RedShirtImaging LLC, Decatur, USA), és egy Olympus BX51WI típusú mikroszkópra van integrálva. A mérésekhez 10X objektívet használtam. Ilyen kísérleti elrendezés mellett egy-egy dióda által detektált terület mérete 70 x 70  $\mu\text{m}$ . A nyugalmi fényintenzitáshoz képest 500-szoros erősítést használtam. A PDA detektor előnye, hogy a mintavételi frekvenciája magas (1,6 kHz), ami lehetővé teszi, hogy a mezőpotenciál (mintavételi frekvencia: 10 kHz) és az optikai jeleket összehasonlíthassuk. Az adatok rögzítéséhez és megjelenítéséhez a Neuroplex programot használtam. Az IOS és a VSD jeleket különböző szeletekből detektáltam, ez alól kivétel volt, amikor az IOS és a VSD jelek amplitúdójának kiterjedését hasonlítottam össze.

A Fluo-4 és a rhodamin 123 festékek fluoreszcenciájának változását konfokális lézer szkennelő mikroszkóppal (FluoView300, Olympus, Magyarország) mértem. A gerjesztő lézer hullámhossza 488 nm volt, míg a detektálást 510-530 nm-en végeztem. A Fluo-4 méréseknél a két kép közötti időintervallum 1,1 másodperc, míg a rhodamin 123 méréseknél 1 perc volt. A két festék jelét különböző szeletekben vizsgáltam. A fluoreszcencia méréseknél nem átlagoltam a jeleket.



### 3.6 Inhibitorok adagolása

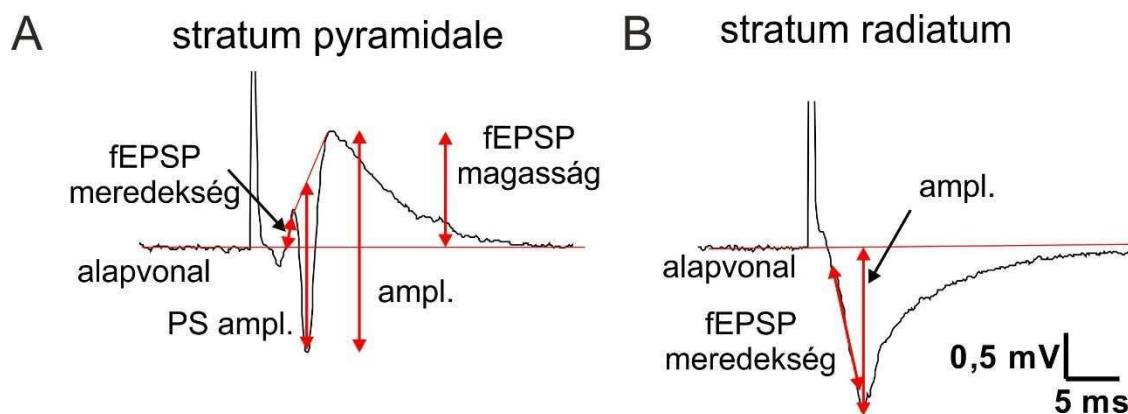
Az inhibitorok adagolása előtt legkevesebb két mérést végeztem, ezek szolgáltak kontrollként. A megfelelő koncentrációjú inhibitorokat ACSF-ben oldva a szeleten 3-4 ml/perc sebességgel áramoltattam át 15 percen keresztül. Az inhibitorok adagolásának megkezdése után 5, illetve 10 perccel végeztem méréseket. Ha ezek nem különböztek statisztikailag, akkor átlagoltam őket, míg ha a két mérési pontban lévő értékeik különböztek, akkor külön-külön vettem őket figyelembe. Hogy biztosítsam a farmakológiai mérések megbízhatóságát, teszteltem a mezőpotenciál és az optikai jelek időbeli stabilitását. Ezeket a méréseket ugyanúgy végeztem és értékeltem ki, de nem adagoltam inhibitort a szeletre.

### 3.7 Emelt $K^+$ koncentrációjú ACSF lokális adagolásával kiváltott IOS mérése

A megemelt kálium koncentrációjú ACSF-ben 47 mM NaCl-t KCl-ra cseréltem, így a  $K^+$  koncentrációt 50 mM-ra állítottam be. Ezt az ACSF-t lokálisan injektáltam a szelet felszínére egy patch pipetta segítségével (átmérő: 5-10  $\mu$ m) 10 másodpercen keresztül. A pipettát 100  $\mu$ m-rel a szelet felszíne fölé helyeztem el, hogy a nyomás miatt bekövetkező mechanikai műtermékeket kiküszöböljem. Kontroll mérésekben normál ACSF-t injektáltam azonos körülmények között. Az emelt  $K^+$  koncentrációjú ACSF-t 10 másodpercig injektáltam a CA1 stratum radiatum és stratum oriens rétegeibe egy 10 másodperces kontroll szakaszt követően. Ennél a mérésnél az IOS jelet 1 percig mértem ugyanazokkal a mérési beállításokkal és ugyanazon a hullámhosszon, mint az afferens ingerlés kiváltotta IOS-t.

### 3.8 Az adatok értékelése

A mezőpotenciál jel 4 paraméterét számoltam: 1) a populációs túske (PS – population spike) amplitúdóját, 2) a posztzinaptikus aktivitás mértékét jelző mező posztzinaptikus potenciál meredekségét (fEPSP – field excitatory postsynaptic potential), 3) a mezőpotenciál jel amplitúdóját, és 4) az fEPSP magasságát. A fEPSP meredekségét és a PS amplitúdóját Anderson és Collingridge munkája alapján számoltam (Anderson és Collingridge, 2001). A mezőpotenciál jel amplitúdóját a jel minimuma és maximuma közötti különbség kiszámolásával kaptam meg, míg az fEPSP magasságát a jel maximuma és az alapvonal átlagának különbségével nyertem (5. ábra).



**5. ábra: A hippocampusz CA1 régiójában mért mezőpotenciál jel komponensei.** A CA1 stratum pyramidaleban (A), és a stratum radiatumban (B) mért mezőpotenciál jel látható. Az ábrán piros nyilak mutatják, hogy a görbék mely része alapján számoltuk a paramétereket. fEPSP – field excitatory postsynaptic potential, mező posztzinaptikus potenciál, PS – population spike, populációs tüske, PS ampl. – populációs tüske amplitúdója, ampl. – mezőpotenciál jel amplitúdó.

Mivel az IOS kiváltásához 10 darab stimulust használtam, ezért a mezőpotenciál jel paramétereit összegeztem és azt hasonlítottam össze az IOS paramétereivel, míg a VSD jel esetében a kiváltáshoz használt egyetlen mezőpotenciál jel paramétereit hasonlítottam a VSD jel paramétereire.

Az mezőpotenciál jel terjedésének sebességét azoknál a méréseknél, ahol egy mérőelektrodot használtam, úgy számoltam, hogy megmértem az ingerlési artefakt és a PS között eltelt időt, majd elosztottam az ingerlő elektrod és a mérőelektrod közötti távolsággal. Azokban a mérésekben, ahol két mérőelektrodot használtam, a két elektrodon mért PS csúcsa között eltelt időt osztottam el a két mérőelektrod távolságával. Mivel a kétféle mérésnél számolt terjedési sebességek nem különböztek, ezért átlagoltam az értékeket.

A jel/zaj viszony javítása érdekében 3 IOS, illetve 5 VSD jelet átlagoltam. Minden egyes adatpontot elosztottam a megfelelő diódán mért nyugalmi fényintenzitás mértékével, hogy csökkentsem a szelet inhomogén fényszórási és festődési mintázatából adódó különbségeket az optikai jelekben. Minden egyes jelet simítottam egy másodrendű polinom modellt és súlyozott legkisebb négyzetek elvét használó lokális regressziós módszerrel (matlab program loess - local regression method using weighted linear least squares and a 2nd degree polynomial model). Az optikai jeleket csak akkor fogadtam el, ha a simított jel jel/zaj aránya  $>5$ . A zaj nagyságát az alapvonal szórásából számoltam.

Az optikai jelalak jellemzésére, illetve az alkalmazott gátlószerek hatásának megállapításához az optikai jelek 7 paraméterét számoltam. Ezek a következők: 1) jel

amplitúdó, 2) 10-90 meredekség (az jel amplitúdójának 10 és 90 %-a közötti szakasz meredeksége), 3) 90-10 lecsengés (az jel amplitúdójának 90 és 10 %-a közötti szakasz meredeksége), 4) a jel hossza (a jel kezdetétől számolva addig a pontig, amíg a jel nagysága az amplitúdó 5%-a alá csökkent), 5) a maximum helye, 6) a görbe alatti terület a jel kezdete és vége között (integrál) és 7) azoknak a diódáknak a száma, ahol jel volt detektálható. Ezeket a paramétereket összegeztem a CA1, CA3 és a DG régiókban, illetve külön kiszámoltam a mezőpotenciált mérő elektród helyének megfeleltethető diódánál. A farmakológiai hatások értékeléséhez egyrészt a CA1 régióban összegzett optikai jelek, illetve a mérőelektród melletti diódán mért optikai jelek paramétereinek változását hasonlítottam össze a CA1 régióban mért mezőpotenciál jel paramétereinek változásával. Másrészt az IOS és VSD jelek paramétereit egymással is összehasonlítottam kontroll körülmények és inhibitor adagolás alatt a CA1, CA3 és a DG régiókban.

Hogy megjelenítsem az inhibitorok hatásának eloszlását a szeletben, az optikai jelek amplitúdójának változását a kontroll és gátlószer alkalmazása alatt ( $\Delta T$  transzmittancia) 2 dimenzióban ábrázoltam.

Az optikai jelek terjedési mintázatának jellemzésére kiszámoltam azt az időpontot, ahol a jel a szignál kezdetétől számítva eléri az amplitúdójának 50 %-át (az ábrákon 50 %-os késésként szerepel). Azért választottam ezt a számolást, mert az optikai jelek maximumának helye nem mindig volt teljesen megbízhatóan detektálható. A VSD jel terjedési sebességét úgy becsültem, hogy két szomszédos dióda közötti távolságot elosztottam a diódák 50 %-os késéseinek különbségével. Az IOS terjedési sebességének becslésekor a két diódán lévő IOS jelek első deriváltjainak csúcsa közötti időkülönbséggel osztottam el a diódák közötti távolságot.

Az optikai jelek és a mezőpotenciál jel viszonyának megállapítására az IOS és a VSD jelek amplitúdóját (kontroll %-ban kifejezve) a teljes CA1-ből véve elosztottam a mezőpotenciál jel amplitúdójával, amit a CA1 régióban mértem. Az optikai jelek összehasonlítására az IOS amplitúdóját (kontroll %-ban kifejezve) elosztottam a VSD jel amplitúdójával (kontroll %-ban kifejezve) a CA1, CA3 és DG régiókban.

Az inhibitorok hatásának statisztikai tesztjéhez Mann-Whitney U tesztet használtam, míg a régiók közötti különbségek kimutatásakor, és amikor több csoport páronkénti összehasonlításra volt szükség, egytényezős variancia analízist (ANOVA) használtam, Levene-teszttel ellenőrizve a varianciák homogenitását és Bonferroni-féle post-hoc teszttel mutattam ki az átlagok közötti különbségeket. A szignifikancia szint minden esetben  $p < 0,05$  volt. Az adatokat átlag $\pm$ standard hiba formátumban adtam meg. Az adatfeldolgozáshoz,

értékeléshez és grafikai megjelenítéshez a pClamp9 (Axon Instruments), Origin 9.0 (Origin-Lab) programokat, valamint MATLAB 6.5 (MathWorks, Nattick, MA) fejlesztői környezetben saját kezűleg írt szkripteket használtam.

## 4 EREDMÉNYEK

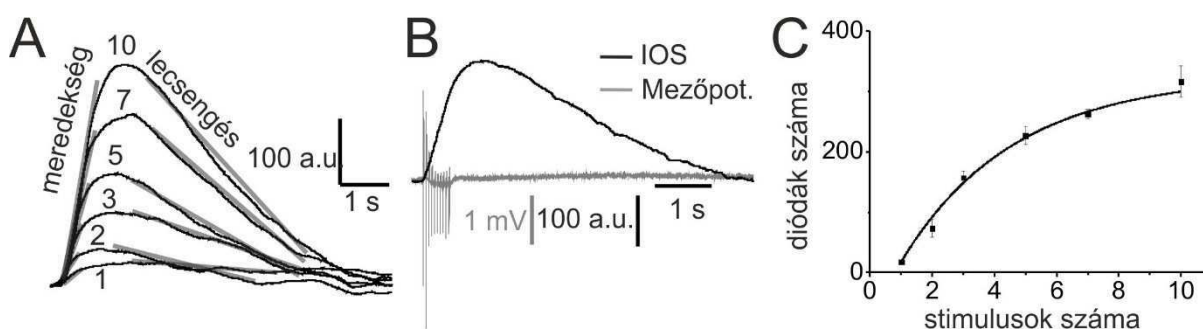
### 4.1 AZ IOS idő- és térbeli lefutása, viszonya a mezőpotenciálhoz

#### 4.1.1 Az IOS időbeli lefutása

Ahhoz, hogy jobban megérthessem az afferens ingerlés kiváltotta belső optikai jel mögött álló sejtes és molekuláris komponenseket, patkány hippocampusz szeletben vizsgáltam a Schaffer kollaterálisok ingerlésével kiváltott optikai jelet és az ezzel egy időben mért mezőpotenciál jelet, illetve a két jel egymáshoz való viszonyát.

Az irodalomban gyakran alkalmazott (Andrew és MacVicar, 1994; Aitken et al., 1999; Buchheim et al., 2005), átlagosan 100 Hz-es mintavételi frekvenciára képes CCD kamerával szemben az általam használt fotodióda mátrix detektor (PDA – Photodiode Array) 0,6 ms-os időbeli felbontással (1,6 kHz-es mintavételi frekvenciával) rendelkezik, ami lehetővé teszi, hogy összehasonlíthassuk az optikai jelet a szimultán mért mezőpotenciállal.

Az IOS jel kiváltásához szükséges protokoll úgy lett optimalizálva, hogy minél kevesebb stimulálással a lehető legjobb jel/zaj arányt érjem el. A megfelelő jel/zaj arányú optikai jel kiváltásához 10 darab 20 Hz-es (450 ms hosszú) stimulusra volt szükség (6. ábra), ami a korábbi IOS kiváltására használt ingerlési protokollokhoz (MacVicar és Hochman, 1991; Buchheim et al., 2005) képest negyedakkora erősségű stimulust és nyolcad olyan hosszú ingerlést jelent.



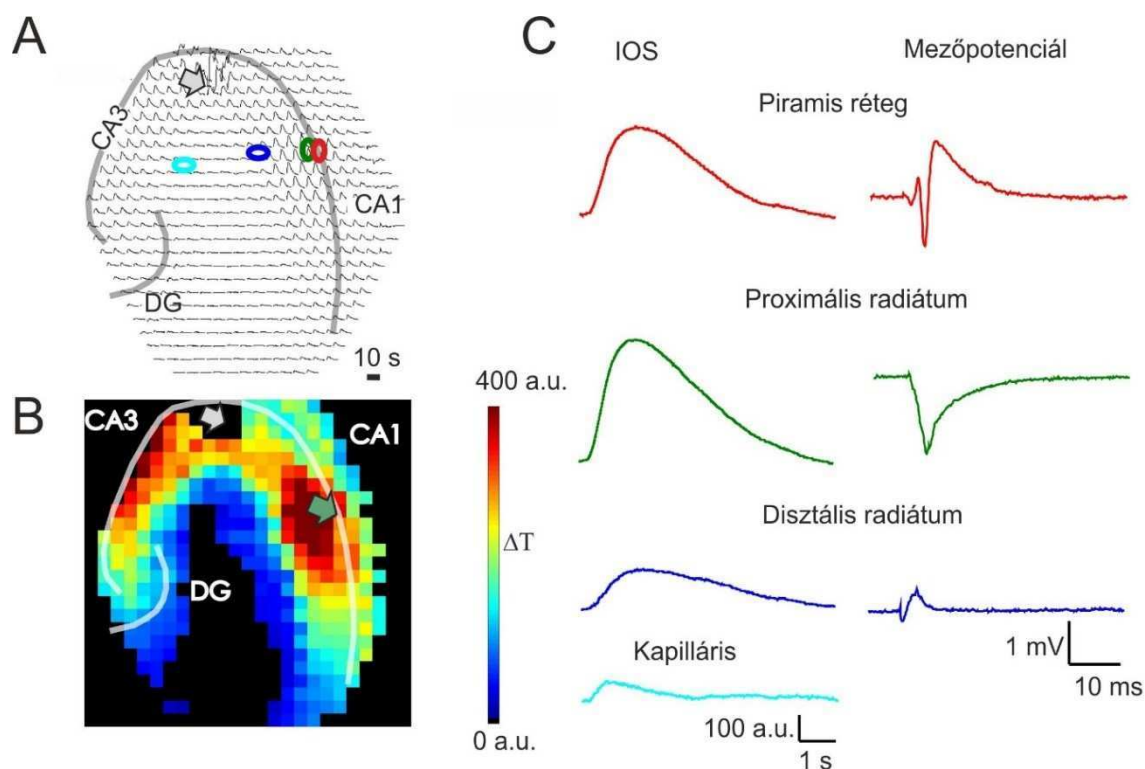
**6. ábra: Az IOS és a mezőpotenciál jel időbeli lefutása és a jelalak stimulusok számától való függése. A:** Az IOS jelalak változása a stimulusok számának növelésével. A görbék feletti számok jelzik a stimulusok számát. Az átlátszó vonalak az illesztett egyenest jelzik az IOS meredekségének és lecsengésének számolásához. **B:** A mezőpotenciál jel és az IOS időskálája. **C:** Az IOS választ mutató diódák és a stimulusok száma közötti korreláció ( $R^2 = 0.99$ ).

Az IOS jel kezdete a mezőpotenciál mérőelektrod közelében egybeesett a mezőpotenciál jel kezdetével, maximumát  $2,5 \pm 0,03$  másodpercen belül érte el és a következő 3,5 másodpercben teljesen lecsengett (az IOS jel hossza átlagosan 6 s, 6. ábra). Mivel az általam alkalmazott stimulálási protokoll rövidebb, mint a korábbi munkákban, az általam mért IOS kétszer gyorsabban éri el a maximumát és hétszer gyorsabban cseng le, mint a korábban mért jelek (MacVicar és Hochman, 1991; Buchheim et al., 2005), bár még így is 12-szer hosszabb, mint a kiváltott mezőpotenciál válaszok összesített hossza (0,5 s).

#### **4.1.2 Az IOS térbeli eloszlása és viszonya a mezőpotenciál jel paramétereire a CA1 különböző sejtrétegekben**

A belső optikai jelek közül a legnagyobb amplitúdójúak a stratum pyramidale és a stratum radiatumnak a piramis réteg közvetlen közelében lévő részében (későbbiekben proximális radiátum) figyelhetők meg a CA1 régió belül, ott ahol a Schaffer kollaterálisok végződnek (7. ábra). Az IOS térbeli eloszlása arra utal, hogy a CA1 mellett a CA3 régió is aktiválódik, ami valószínűleg abból fakad, hogy a CA3 axonokon visszaterjed az inger (antidromikus aktiválódás), illetve aktiválódnak a CA3 piramis sejtek közötti asszociációs pályák. A CA3 régió kívül az IOS a DG-ben is megjelent az esetek 70 %-ában, ami valószínűleg a moharostok antidromikus aktiválódását mutatja.

Alkalmanként megfigyeltem rövidebb IOS jeleket, amelyeknél a jel maximuma egybeesik a stimulálás végével, ezek legtöbbször a stratum radiatum és a lacunosum-molaculare rétegekben voltak láthatóak a vérereknek megfelelően diódákon. Ezek a jelek tetrodotoxin adagolása alatt is jelen voltak, és mivel a vérerek közelében figyeltem meg őket, ez arra utal, hogy ezek a jellegzetes jelalakú IOS jelek a szeletben lévő erek összehúzódását mutatják, amelyek valószínűleg feszültségfüggő kalcium csatornák révén aktiválódnak (Kuo et al., 2011). Az erek összehúzódásához köthető optikai jeleket a jelalakjuk alapján (a maximum hely  $< 1,5$  s, a jel hossza  $< 2$  s 7. ábra) elkülönítettem a többi IOS jeltől. Ezek a jelek az összes IOS szignál kevesebb, mint 5 %-át tették ki. Az erekhez köthető optikai jelek nem kerültek be az értékelendő IOS jelek közé.



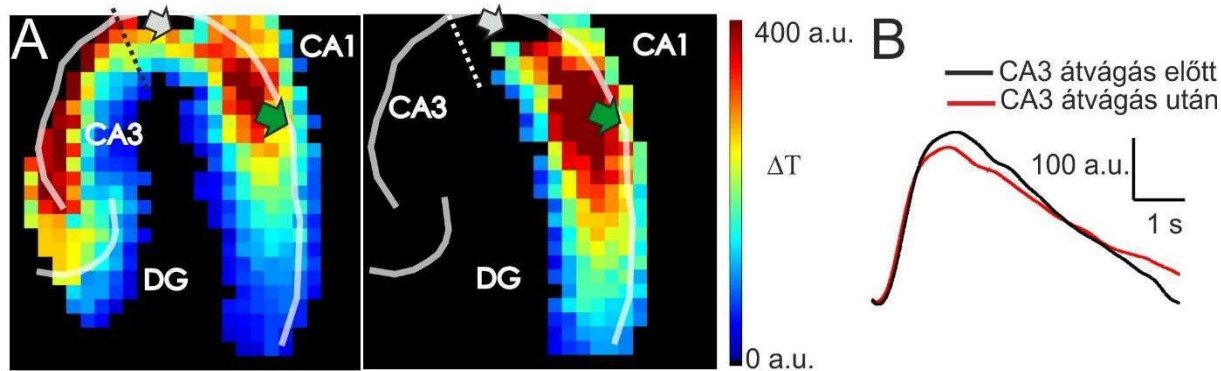
**7. ábra: Az IOS és a mezőpotenciál jel időbeli lefutása és térbeli eloszlása.** **A:** Az IOS görbék eloszlása a 464-elemű fotodióda mátrixon. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerőlektrod helyzetét nyíl mutatja, míg a mezőpotenciál mérőlektrod pozícióit a színes ellipszisek jelzik. **B:** az IOS amplitúdójának 2D eloszlása. Az ingerő elektrod helyét szürke, míg a mérőlektrod helyét zöld nyilak mutatják. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja. **C:** Reprezentatív IOS és mezőpotenciál jel görbék a CA1 különböző rétegeiben mérve. A jelek pontos származási helyét a színes ellipszisek mutatják a bal felső ábrán.

A CA1 régióban a rétegeken belül az IOS jel amplitúdója egyenletesen csökkent a proximális radiátumtól távolodva ( $23,9 \pm 1,8 \text{ \%}/100 \text{ }\mu\text{m}$ ). Mivel a gliasejtek többsége a stratum radiatum piramis rétegtől távolabbi (disztális radiátum) részében található, a tény hogy az IOS jel amplitúdója relatíve nagy a piramis rétegben ellentmondásban van az állítással, hogy az IOS jel kizárólagosan gliasejt eredetű lenne (MacVicar és Hochman, 1991), sőt inkább azt mutatja, hogy a gliasejtek mellett a neuronok is részt vesznek az IOS kialakításában.

Ahhoz, hogy a CA1 különböző sejtrétegeiben az IOS-t és a mezőpotenciál jelet összehasonlíthassam, egyszerre két mérőlektroddal mértem mezőpotenciált párhuzamosan az IOS-sal. Az egyik mérőlektrodot az ingerőlektroddhoz közelre ( $300 \text{ }\mu\text{m}$ -en belülre) helyeztem el, ez az elektrod szolgált referenciaként, hogy adott pontban, időben változik-e a mezőpotenciál amplitúdója. A másik elektrodot az ingerőlektrodtól távolabb ( $> 300 \text{ }\mu\text{m}$ ) a piramis rétegbe, a proximális, illetve a disztális radiátumba helyeztem. Az 7. ábrán látható, hogy mind a mezőpotenciál, mind az IOS jelalakja jellegzetesen változik a különböző sejtrétegekben, illetve a piramis rétegtől való különböző távolságokban.

Elsőként a CA1 régió különböző sejtrétegeiben (piramis réteg, proximális és disztális radiátum) mért fEPSP meredekségét hasonlítottam össze a mérőelektród közelében mért IOS amplitúdójával. Mivel a PS nincs jelen az összes sejtrétegben, illetve az fEPSP meredekségének előjele változik a piramis rétegtől távolodva, ezért a fEPSP meredekségének abszolút értéke szolgált a számolás alapjául. A proximális és a disztális radiátumban az fEPSP meredekség és az IOS amplitúdó nem mutattak korrelációt ( $R=0$  a proximális és  $R=0$  a disztális radiátum esetében). A jelenség magyarázata valószínűleg az, hogy az asztrociták ezekben a rétegekben jóval nagyobb mértékben járulnak hozzá az IOS-hoz, mint az fEPSP meredekségéhez. A piramis rétegben az IOS amplitúdója és az fEPSP meredeksége viszont lineáris korrelációt mutatott ( $R=0,86$ ), ami arra utal, hogy a piramis rétegben a neuronok hozzájárulása az IOS-hoz összhangban van az fEPSP meredekségéhez való hozzájárulásukkal. Az fEPSP meredeksége mellett az IOS jel amplitúdója a piramis rétegben lineáris összefüggést mutatott a mezőpotenciál jel további paramétereivel is (PS amplitúdó  $R=0,98$ , mezőpotenciál jel amplitúdó  $R=0,93$ , fEPSP magasság  $R=0,89$ ), ami azt jelzi, hogy az IOS jól korrelál a neuronális aktivitással. Érdeemes megemlíteni továbbá, hogy az IOS jel amplitúdója szintén lineárisan korrelál az IOS görbe meredekségével ( $R=0,97$ ) és lecsengésével ( $R=-0,94$ ), ami azt sugallja, hogy a jelalakot leginkább az amplitúdó nagysága határozza meg.

Továbbá, meg kell jegyezni, hogy a PS és a teljes szelet összegzett IOS amplitúdója szintén mutatott korrelációt ( $R=0,72$ ), ami arra utal, hogy mind az egy pontban mért mezőpotenciál, mind az IOS kontroll körülmények között jól jelzik a teljes szelet aktivitásának mértékét.



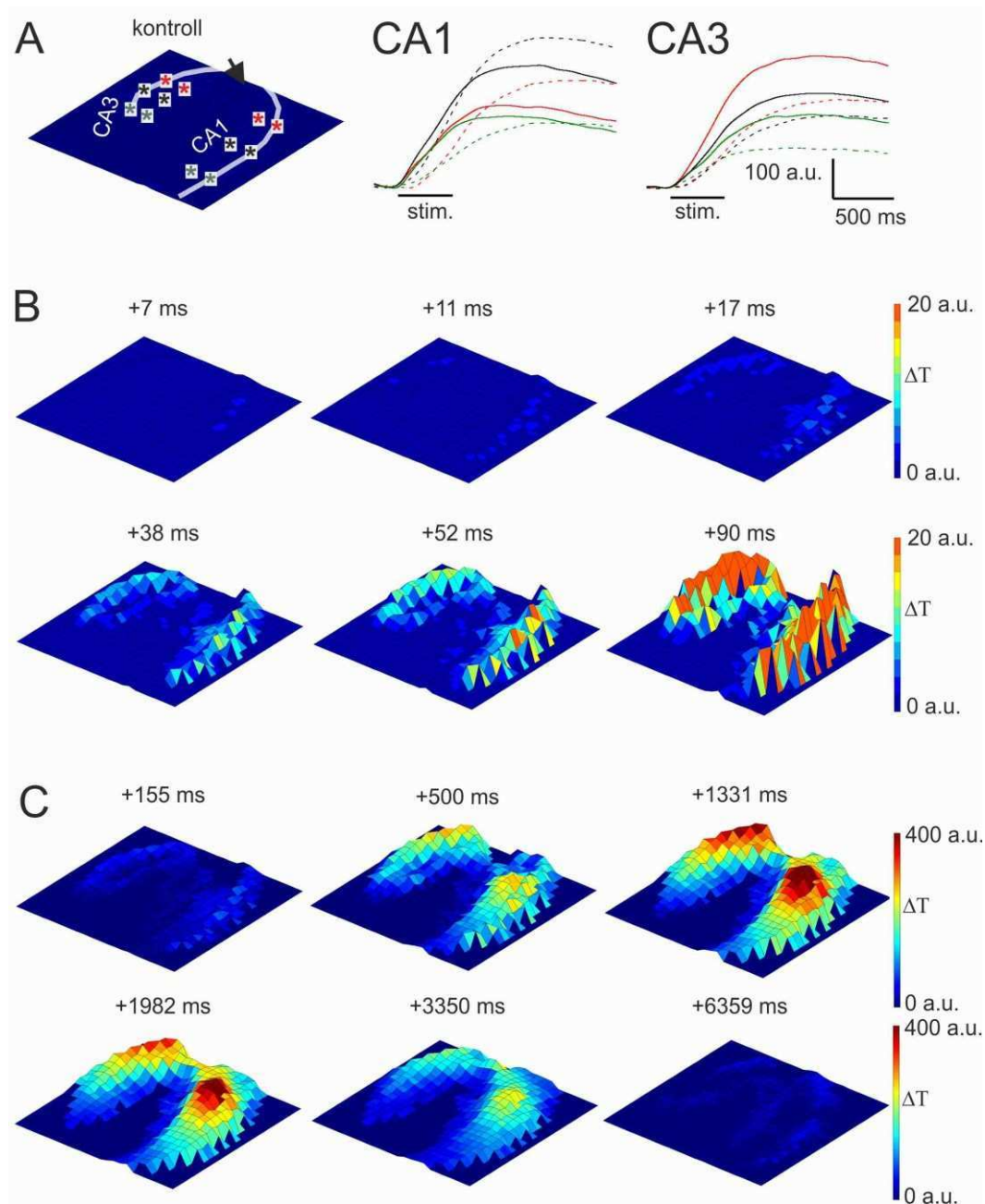
**8. ábra: A CA3 átvágásának hatása az IOS jel amplitúdójának eloszlására. A:** 2D IOS amplitúdó térképek a CA3 régió átvágása előtt (balra) és után (középen) az ingerlő elektród és a CA3 régió között. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mérőelektród helyét zöld nyilak mutatják. A vágás helyét szaggatott vonal jelzi. **B:** Reprezentatív IOS görbék a mérőelektród közeléből (zöld nyíllal jelölve) a CA3 átvágása előtt (fekete) és után (piros) az ingerlő elektród és a CA3 régió között. A két görbe között látható kis különbséget valószínűleg az okozza, hogy kis mértékben a mezőpotenciál jel is csökkent a vágás után.

Mivel az ortodromikusan aktiválódó CA1 mellett antidromikusan a CA3 és a DG is aktiválódik, valamint az általam használt preparátumban jelen vannak a hippokampusz proper és az entorhinális kérget összekötő kapcsolatok, ezeken a kapcsolatokon keresztül az aktiválódott CA3 piramis sejtek hozzájárulhatnak a CA1-ben mért IOS-hoz (Barbarosie és Avoli, 1997). Hogy el lehessen dönteni, hogy milyen mértékben járul hozzá a CA3-ból kiinduló hálózati aktivitás a CA1-ben mért IOS térbeli eloszlásához és időbeli lefutásához, elvégeztem egy mérésorozatot, melyben megmértem az IOS-t kontroll körülmények között, majd azt követően, hogy átvágtam a szeletet a CA3 és az ingerlőelektród között. A CA3 és a CA1 közötti kapcsolatok megszüntetése után a CA3-ból teljesen eltűnt az IOS (8. ábra). A CA1 régióban az IOS térbeli eloszlása és az időbeli lefutása viszont nem változott, ami arra utal, hogy a CA1-ben az IOS-hoz csak a Schaffer kollaterálisok aktiválódása folytán bekövetkező neurális aktivitás a felelős.

#### **4.1.3 Az IOS terjedése**

A PDA nagy mintavételi frekvenciája lehetővé teszi, hogy az IOS jel kialakulását időben is követhessük (9. ábra). A stimulálás kezdetét követően az IOS elsőként a CA1 piramis rétegében jelenik meg, majd a radiátumban ahol a Schaffer kollaterálisok végződnek, majd ezt követően a piramis réteg többi részében párhuzamosan a CA1-ben és a CA3-ban. Ez a jelenség arra utal, hogy a neuronok aktiválódása megelőzi az IOS jel kialakulását, valószínűleg azért, mert a jel detektálási küszöbét előbb éri a piramis sejtek sejttesteinek rétegében, mint a dendriteken, vagy a neuronok duzzadása gyorsabb, mint a gliasejteké.





**9. ábra: Az IOS jel időbeli lefutása. A balra:** A szelet orientációja. Az áttetsző vonal a piramis réteget jelzi, míg az ingerlőelektrod helyzetét nyíl mutatja. **A középen és jobbra:** Reprezentatív IOS görbék a CA1 és CA3 régiókból. A görbék származási helyét a színes csillagok mutatják a szelet orientációján. A szaggatott IOS görbék a stratum radiatumból, a folytonos görbék a stratum pyramidale-ból származnak. **B:** A különböző időpillanatokban készült 3D IOS amplitúdó térképek az IOS térbeli megjelenésének első 90 ms-át mutatják a jel kezdetéhez viszonyítva. A szelet orientációját az ábra A részének bal oldala mutatja. **C:** A különböző időpillanatokban készült 3D IOS amplitúdó térképek az IOS térbeli megjelenésének teljes dinamikáját mutatják a jel kezdetéhez viszonyítva. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja. Módosítva Pál et al. cikkéből (Pál et al., 2013).

A CA1 radiátumban az IOS először ott jelenik meg ahol a Schaffer kollaterálisok „en passant” szinapszisokat formálnak a CA1 piramis sejtek dendritjein (Tzingounis és Wadiche, 2007), majd onnan két irányban terjed: 1) az ingerlő elektród felé és a 2) a szubikulum felé (9. ábra). Az IOS terjedésének becsült sebessége  $0,23 \pm 0,05 \mu\text{m/ms}$  ami három nagyságrenddel lassabb, mint a mezőpotenciál jel terjedésének sebessége ( $240 \pm 12 \mu\text{m/ms}$ ), viszont egy nagyságrenddel gyorsabb, mint az elektromos stimulálással kiváltott ATP mediálta  $\text{Ca}^{2+}$  hullám ( $0,014 \pm 0,005 \mu\text{m/ms}$ ) egér cortexben (Haas et al., 2006). Ellentétben a CA1-gyel, a CA3-ban az IOS a piramis rétegből a radiátum felé terjed, de a piramisréteg mentén nem.

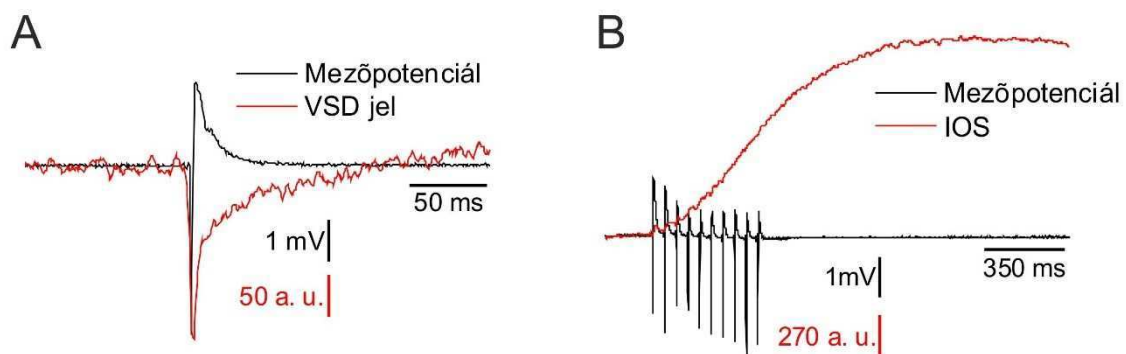
Az IOS görbék megjelenése és lefutása a CA3-ban és a CA1-ben jellegzetesen különbözik. A CA3-ban, ami antidromikusan van stimulálva, az IOS amplitúdója a radiátumban kisebb, mint a piramis rétegben. Ezzel szemben a CA1-ben amit orthodromikusan stimuláltam éppen az ellenkezője igaz, az IOS amplitúdója nagyobb a radiátumban, mint a piramis rétegben. Az IOS görbék lefutásának különbsége a különbözőképpen stimulált régiókban azt jelzi, hogy a nagy időbeli felbontású IOS képalkotással nemcsak az idegi aktivitás terjedését követhetjük, hanem különbséget lehet vele tenni az eltérő módon aktiválódott területek (orto- vs. antidromikus) aktivitásmintázata között. Összegezve, a nagy időbeli felbontású IOS képalkotással sokkal finomabb különbségeket is ki lehet mutatni az idegszövet aktivációjának mintázatában, mint a hagyományos IOS képalkotással.

## **4.2 A VSD jel idő- és térbeli lefutása, aránya a mezőpotenciálhoz és az IOS-hoz**

### **4.2.1 A VSD jel időbeli lefutása**

A VSD jel hasonló időskálájú, mint a mezőpotenciál jel (10. ábra). Maximumát átlagosan  $4,7 \pm 0,1 \text{ ms}$  alatt éri el, ami igen hasonló a stimuláció és a PS csúcsa között eltelt időhöz ( $4,2 \pm 0,2 \text{ ms}$ ). A jel felfutása 16-szor gyorsabb, mint a lecsengése (107 ms). A VSD jel teljes hossza  $113,8 \pm 3,6 \text{ ms}$  (a CA1 piramis rétegben a mérőelektród mellett), ami 2,8-szorosa a mezőpotenciál jel hosszának ( $40,6 \pm 1,0 \text{ ms}$ ). Az hogy a VSD jel hosszabb, mint a mezőpotenciál jel, valószínűleg arra utalhat, hogy a két jel komponensei különböznek. A VSD jel 7 ms-on belüli része nagyon hasonlít a mezőpotenciál jel PS-éhez, legalábbis ami a felfutását illeti, majd azt követi egy hosszú lecsengés, ami arányaiban jóval hosszabb, mint a mezőpotenciál jel. Ez utalhat arra, hogy a gliasejtek, amikben a membránpotenciál változások jóval lassabbak (Amzica és Steriade, 2000) hozzájárulhatnak a VSD jelhez. Érdekes megjegyezni, hogy Kojima és munkatársai két komponensét különböztetik meg a VSD jelnek: egy gyors és egy lassú depolarizációs választ (Kojima et al., 1999). Az általuk gyors depolarizációs válasznak nevezett

komponensről nem adnak időbeli leírást, de az ábrák alapján nagyon hasonló időskálán van az általam mérttel. A lassú depolarizációs válasznak nevezett komponens csúcsát a preszinaptikus fiber volley megjelenése után  $16,2 \pm 1,6$  ms belül érte el és amplitúdója  $27,6 \pm 4,3$  ms alatt csökkent a felére (Kojima et al., 1999). Ha összegezzük a fenti két számot, akkor azt kapjuk, hogy a Kojima és munkatársai által mért lassú jel a preszinaptikus fiber volley megjelenésétől számítva  $43,8$  ms alatt csökkent a felére. Ezen adatok és a Kojima és munkatársai cikkében található ábrák alapján (Kojima et al., 1999) a lassú depolarizációs komponens teljes hosszát  $70$  ms hosszúságúra becsülhetjük. Ez azt mutatja, hogy a VSD jel időskáláját tekintve az általam mért adatok összhangban vannak a korábbi irodalmi adatokkal.



**10. ábra: A VSD jel és az IOS időbeli összehasonlítása a kiváltott válasszal.** A VSD jel (A) és az IOS (B) időbeli lefutása összehasonlítva a mezőpotenciál jellel.

Ha az VSD jel időbeli lefutását az IOS-éhoz hasonlítjuk, összességében azt mondhatjuk, hogy a VSD jel az IOS-nál jóval gyorsabb, a VSD jel a milliszekundumos, míg az IOS a másodperces időskálán játszódik le (10. ábra). Az IOS 12-szer, míg a VSD csak 2,8-szor hosszabb, mint a mezőpotenciál jel. Mindkét optikai jel megjelenése egybeesik a mezőpotenciál jel megjelenésével, viszont az IOS maximumát a mezőpotenciál jel lecsengése után éri el. Mindkét jel lecsengése hosszabb, mint a felfutása, de a VSD esetében ez a különbség sokkal nagyobb (IOS esetében ez 1,4-szer, míg a VSD jelnél 16-szor hosszabb).

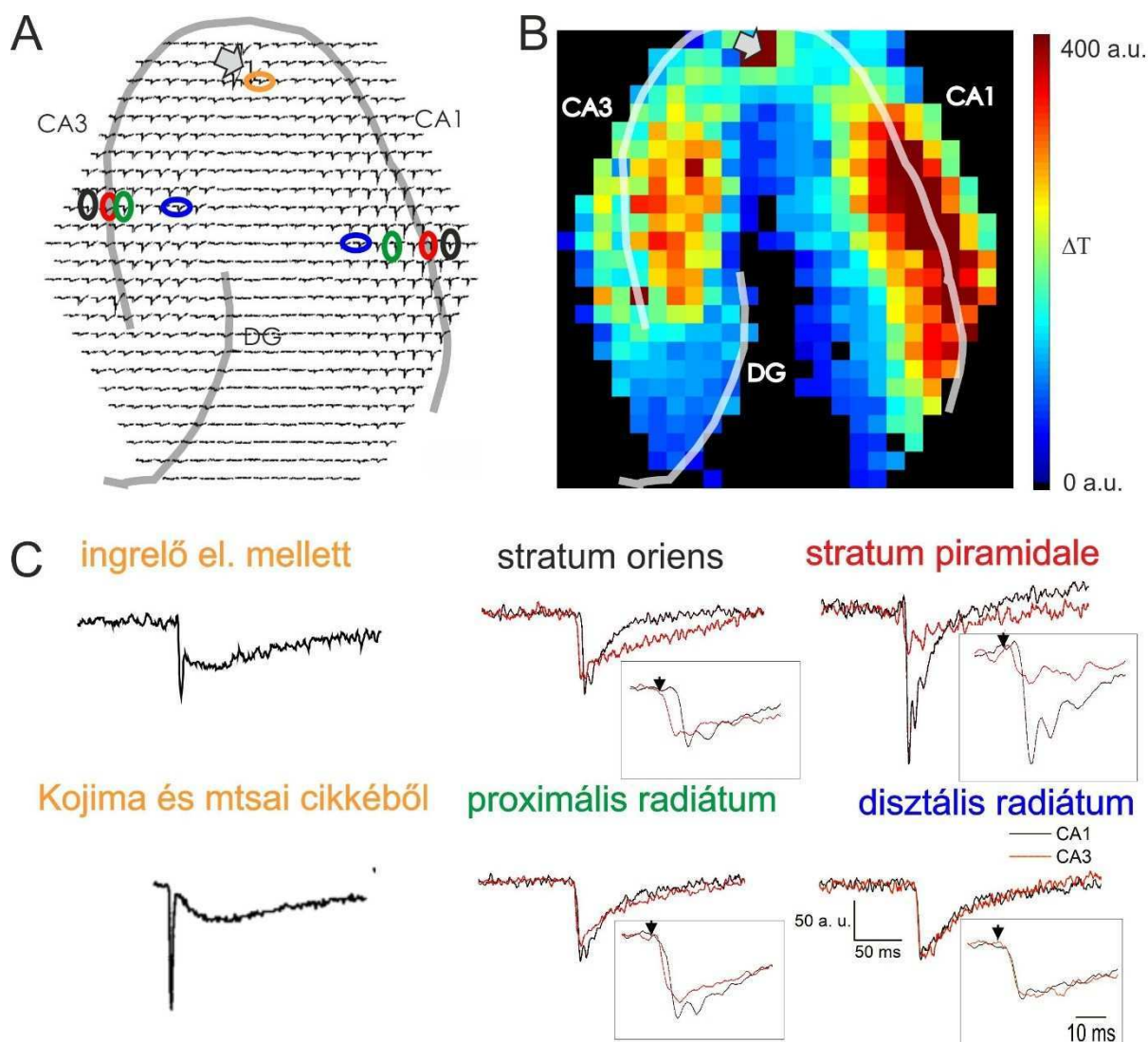
#### 4.2.2 A VSD jel térbeli eloszlása

A VSD jel a CA1-en belül szintén a piramis rétegben és a stratum radiatum piramisréteghez közeli részén mutat maximális amplitúdót, viszont a stratum oriensben is viszonylag nagy az IOS-hoz viszonyítva (11. ábra). A CA1 piramis rétegben a mezőpotenciál mérőelektrod közelében a VSD jel amplitúdója lineáris korrelációt mutat a mezőpotenciál jel paramétereivel, ( $R=0,99$  a PS amplitúdó,  $R=0,98$  az fEPSP meredekség,  $R=0,99$  a mezőpotenciál jel amplitúdója és  $R=0,98$  az fEPSP magassága esetén). Ez az összefüggés azt

mutatja, hogy a VSD jel lineárisan korrelál a neuronális aktivitás mértékével, legalábbis a mérőelektrod közvetlen közelében. A VSD jel esetében is megfigyelhető volt korreláció a VSD jel amplitúdója és meredeksége ( $R=0,99$ ), illetve lecsengése ( $R=0,86$ ) között. Emellett a jel integrálja is lineáris korrelációt mutat az amplitúdóval ( $R=0,96$ ). Ezen összefüggések azt mutatják, hogy az amplitúdó jól jellemzi a VSD jelet, hiszen a korreláció alapján az amplitúdóból következtethetünk a többi paraméter értékére.

A VSD jel amplitúdója hasonlóan az IOS-nál megfigyeltékhez csökkenést mutat a piramis rétegről való távolsággal ( $16,9 \pm 4,4$  % /  $100 \mu\text{m}$ ). A CA1-en kívül a VSD jel szintén számottevő nagyságú a CA3-ban és az esetek 70 %-ában a DG-ben is detektálható. Az IOS-nál látottakhoz hasonlóan ez a CA3 axonok, CA3-CA3 asszociációs pályák és a moharostok aktiválódását mutatja.

A VSD jel eloszlása a különböző sejtrétegekben a CA3-on belül lényegesen eltér a CA1-ben látott eloszlástól (11. ábra). Ellentétben a CA1-ben látottakkal, a CA3-ban a disztális radiátumban volt a legnagyobb a VSD jel amplitúdója, nem a proximális radiátumban vagy a piramis rétegben. Mivel a két régió nyugalmi fényelnyelése nagyon hasonló, ezért nem valószínű, hogy a különbség a két régió különböző mértékű festődéséből adódna. Sokkal valószínűbb, hogy a két régióban lévő anatómiai különbségekből (Schultz és Engelhardt, 2014) vagy az aktiválódás különbségéből fakad, mivel a CA1 orto- míg a CA3 antidromikusan aktiválódik.



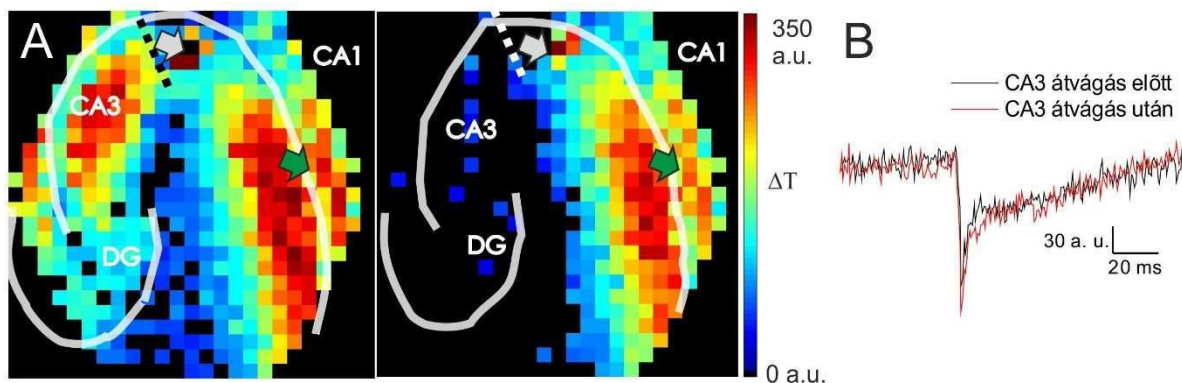
**11. ábra: A VSD jelek és amplitúdó a különböző régiókban.** **A:** VSD görbék eloszlása a 464-elemű fotodiódá mátrixon látható. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerlő elektród helyzetét nyíl mutatja, míg a VSD jelek származási helyét (C) színes ellipszisek jelzik. **B:** VSD jel amplitúdójának 2D eloszlása. Az ingerlő elektród helyét szürke nyíl mutatja. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja. **C:** reprezentatív VSD görbék a CA1 és CA3 régiókból valamint az ingerlő elektród közeléből. A görbék származási helyét az ábra A részén látható színes ellipszisek jelzik. Ez alól kivétel a bal alsó sarokban található görbe, ami Kojima és munkatársai cikkéből lett módosítva (Kojima et al., 1999). A CA1 és a CA3 különböző rétegeiből származó görbék mellett látható a kinagyított képük, hogy a CA1 és CA3-ból vett görbék időbeli lefutását össze lehessen hasonlítani.

A sejtrétegeken belüli eloszláson túl különbségek vannak a CA3 és a CA1 között a stratum oriensben, a proximális radiátumban és a piramis rétegben lévő VSD jelek alakjában is, míg a disztális radiátumban nagyon hasonló a jelek (11. ábra). A VSD jelekben lévő különbségek ismét fakadhatnak a két régió anatómiai (Andersen et al., 2007) és aktiválódási különbségeiből (orto- versus antidromikus). Itt térnék ki egy érdekes megfigyelésemre, ami



eltér a Kojima és munkatársai által megfigyeltektől. Az általuk leírt (Kojima et al., 1999) két csúcsú VSD jel az általam használt kísérleti elrendezésben csak az ingerlő elektród mintegy 300  $\mu\text{m}$ -es körzetében volt megfigyelhető, az ettől távolabbi területeken a VSD görbe nem mutatott 2 csúcsot, hanem egyenletesen csengett le (11. ábra). Felmerülhet a kérdés, hogy a Kojima és munkatársai által használt kísérleti elrendezés nem vezetett-e a VSD jel komponenseit illető téves következtetésekhez. Felvethető ugyanis, hogy az általuk megfigyelt jelalak esetleg az ingerlő elektród közelségéből fakad, ezáltal az általuk detektált VSD jel egy sokkal agresszívebb stimulálás eredménye, ami kevésbé mutathat hasonlóságot a fiziológias állapotokkal.

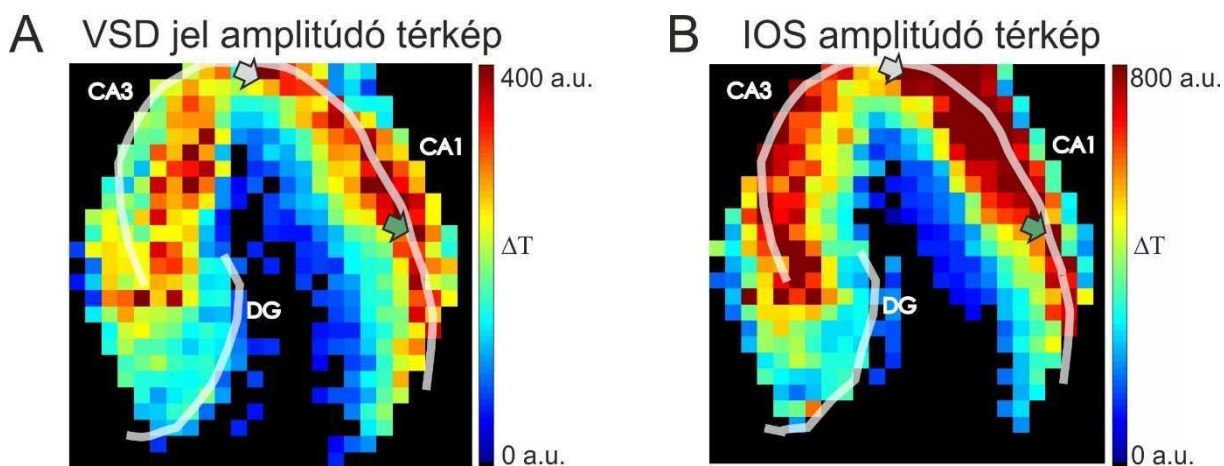
Mivel a VSD jel esetében is aktiválódik a CA3 és a DG, ezért az IOS-hoz hasonlóan a VSD esetében is megmértem a jelet a szelet ingerlő elektród és CA3 közötti átvágása előtt és után. Ennek következtében a VSD jel teljesen eltűnt a CA3 és a DG régiókból, viszont a CA1-ben ugyanolyan mintázatot mutatott és a jel alakja sem változott meg (12. ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy a CA1-ben detektált VSD jelhez kizárólag a Schaffer kollaterálisok aktiválódása következtében bekövetkező aktivitás járul hozzá, a CA3 aktiválódása következtében esetlegesen visszaterjedő aktivitás nem.



**12. ábra: CA3 átvágásának hatása a VSD jel amplitúdójára.** **A:** 2D VSD jel amplitúdó térképek a CA3 régió átvágása előtt (balra) és után (középen) az ingerlő elektród és a CA3 régió között. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mérőelektród helyét zöld nyilak mutatják. **B:** Reprezentatív VSD jel görbék a mérőelektród közeléből (zöld nyíllal jelölve) a CA3 átvágása előtt (fekete) és után (piros) az ingerlő elektród és a CA3 régió között. A két görbe között látható kis különbséget valószínűleg az okozza, hogy kis mértékben a mezőpotenciál jel is változott a vágás után.

A 13. ábrán látható az azonos szeletből mért IOS és VSD jelek (a VSD jelet 1 stimulussal, míg az IOS-t 10 darab 20 Hz-es stimulussal váltottam ki, a két jelet nem egy időben mértem) amplitúdójának eloszlása a szelet különböző régióiban. Jól látható, hogy a két optikai jel 2 dimenziós kiterjedése a szeletben nagyjából azonos. Az IOS kiterjedése nem számottevően, de kisebb, annak ellenére, hogy az IOS-nál hosszabb stimulálási protokollt

alkalmaztam. Mindkét optikai jel esetében aktiválódik a CA1-en kívül a CA3 és a DG is. A CA1 régió belül az amplitúdók eloszlása a különböző sejtrétegeken belül azonos mintázatot mutat. Mindkét esetben az optikai jelek maximuma a piramis rétegben illetve a proximális radiátum van, és igen hasonlóan csökken a jelek amplitúdója a piramis rétegtől való távolsággal.



**13. ábra: A VSD jel és az IOS amplitúdója térbeli eloszlásának összehasonlítása. A:** VSD jel, **B:** IOS amplitúdójának 2D eloszlása. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mezőpotenciál elektród helyét zöld nyíl mutatja. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja.

A CA3-ban viszont a VSD és IOS jelek amplitúdójának eloszlása a sejtrétegek között jelentősen különbözik. Míg az IOS szintén a piramis rétegben és a proximális radiátumban mutatja a maximális amplitúdót, addig a VSD jel amplitúdója a disztális radiátumban a legnagyobb és a piramis rétegben a legkisebb. A két optikai jel amplitúdó eloszlásának különbsége a CA3-ban érdekes jelenség és utal a jelek eredetének különbségére. Az IOS-ról feltételezik, hogy a sejtduzzadást mutatja, ezért a jelenség magyarázata lehet, hogy a CA3 piramis rétege és radiatuma a sejtduzzadás szempontjából különbözik a CA1-től. Ez elképzelhető úgy, hogy CA3 piramis rétege kisebb membránpotenciál változás hatására is jobban duzzadhat, mint a radiátum. Az is lehetséges, hogy az antidromikusan aktivált piramis réteg (CA3) jobban duzzad, mint az ortodromikusan aktivált (CA1).

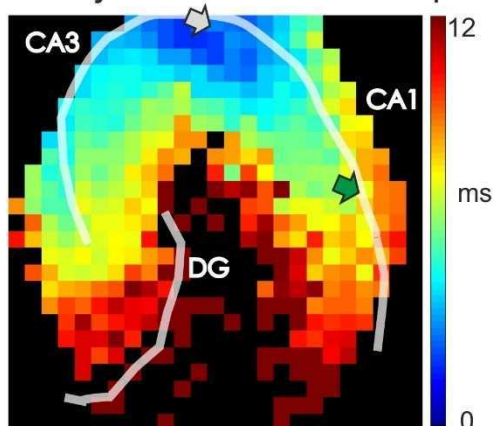
Az egyes régiókon belüli különbségek ellenére azt mondhatjuk, hogy bár a két optikai jelet kialakító folyamatok igen különbözőek, mindkét optikai jól leírja az aktiválódott terület nagyságát.

### 4.2.3 A VSD jel terjedése

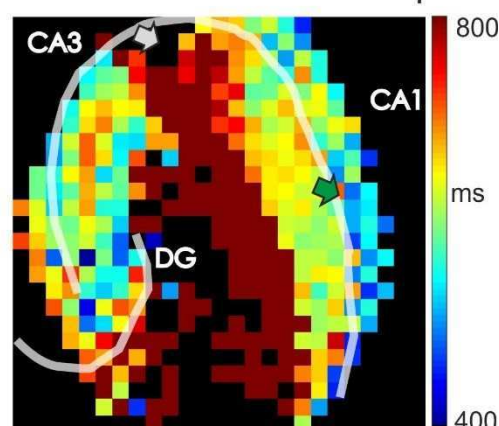
Mivel az általam használt gyors képalkotás lehetővé teszi, nyomon követtem a VSD jel terjedését a szeletben. A VSD jel elsőként az ingerlő elektród közvetlen közelében jelenik meg, majd a CA1-ben és a CA3-ban párhuzamosan terjed a piramis réteg mentén a szubikulum felé, illetve a DG-be (14. ábra). A jel terjedése a piramis rétegben kissé megelőzi a radiátumban lévő terjedést.

A VSD jel terjedése a különböző sejtrétegekben különbözik a CA1 és a CA3 között (14. ábra). Ez a legjelentősebb a stratum oriens esetében. A CA3-ban a stratum oriensben a VSD jel terjedése megelőzi, vagy egyszerre indul a többi rétegben lévő VSD jelekével, míg a CA1-ben a stratum oriens rétegében lassabban terjed a piramis rétegnél és a radiatumnál (14. ábra, A). Ebből következően a VSD jel terjedési mintázata alapján különbséget tehetünk az orto- és az antidromikusan aktiválódott területek között.

**A** VSD jel 50% késés térkép



**B** IOS 50% késés térkép



**14. ábra: A VSD jel és IOS terjedési mintázatának összehasonlítása. A: VSD jel, B: IOS 50% késésének 2D eloszlása látható. Az 50% késés az optikai szignál kezdetétől véve azt az időpontot jelöli, ahol a jel eléri az amplitúdójának 50 %-át. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mezőpotenciál elektród helyét zöld nyíl mutatja. A színskala az 50% késés változását mutatja.**

A VSD jel átlagosan 12 ms-on belül átszeli a szelet teljes hosszát, terjedési sebessége  $300 \pm 80 \mu\text{m/ms}$ , ami összhangban van a mezőpotenciál jel alapján számolt neuronális aktivitás terjedési sebességével ( $240 \pm 12 \mu\text{m/ms}$ ), valamint az irodalmi adatokkal. Meeks és Mennerick méréseik alapján a CA3 piramis sejteken az akciós potenciál terjedésének sebességét  $300 \mu\text{m/ms}$ -re becsülték (Meeks és Mennerick, 2007b), míg Schmidt-Hieber és munkatársai a moharostokon való akciós potenciál terjedési sebességére kapott nagyon hasonló  $230 \mu\text{m/ms}$ -



os adatot (Schmidt-Hieber et al., 2008). A VSD jel terjedési sebessége 3 nagyságrenddel gyorsabb, mint az IOS-é ( $0,23 \pm 0,05 \mu\text{m/ms}$ ).

A 14. ábrán látható, hogy az IOS és a VSD jel terjedési mintázata teljesen különböző. Ez arra utal, hogy az IOS terjedése nem követi a VSD jel által indukált depolarizációs szekvenciát.

Összefoglalva, a VSD és IOS görbék időbeli lefutásában lévő különbségek alapján mindkét jel alkalmas a különbözőképpen (orto- és antidromikus) aktiválódott területek megkülönböztetésére és jól leírják az aktiválódott terület nagyságát. Ugyanakkor az időbeli lefutásukban, térbeli eloszlásukban, terjedési mintázatukban és sebességükben látható különbségek arra utalnak, hogy a két optikai jel kialakításában különböző folyamatok vesznek részt.

### **4.3 IOS és VSD jelek farmakológiai jellemzése**

Annak érdekében, hogy az optikai jeleket kialakító sejt típusokat és molekuláris folyamatokat azonosítsam, farmakológiai megközelítést alkalmaztam. Az optikai jelek kialakításában potenciálisan részt vevő fehérjéket specifikus gátlószerekkel blokkoltam, majd az IOS és VSD jelekben ennek hatására bekövetkező változásokat hasonlítottam össze a mezőpotenciál jelek változásával. Mivel mindkét optikai jelre igaz, hogy a neuronális aktivitást követi, ezért vizsgáltam a feszültségfüggő  $\text{Na}^+$ -csatornák, illetve a serkentő (ionotróp glutaminsav receptorok) és gátló ( $\text{GABA}_A$  receptor) neurotranszmitter receptorok szerepét az optikai jelek kialakításában. Feltételezem továbbá, hogy az IOS főképp a KCl felvétel okozta asztroglialis sejtduzzadást mutatja, illetve a VSD jelben is szerepet játszhat az asztroglia sejtek glutaminsav és KCl felvétele, ezért vizsgáltam azoknak a fehérjéknek a szerepét az optikai jelek kialakításában, amik szerepet játszanak a sejtduzzadásban és a kálium ionok felvételében, mint például az asztroglialis glutaminsav transzporter, az NKCC1, a  $\text{K}_{\text{ir}4.1}$ , az NKA és az anion csatornák. Mivel az asztrociták potenciálisan részt vesznek az IOS kialakításában, és ismert, hogy az asztrociták aktiválódnak a  $\text{P2Y}_1$  receptoron keresztül, ezért megvizsgáltam ezen receptor szerepét is az IOS kialakításában.

Vizsgálataim során a következőképpen jártam el: elsőként megvizsgáltam, hogy az adott optikai jel és a vele egy időben mért mezőpotenciál jel hogyan változik az alkalmazott inhibitor hatására a kontroll körülményekhez képest. Összehasonlítottam a CA1-ben mért mezőpotenciál jel paramétereinek változását a teljes CA1-ben és a mérőelektród közelében lévő diódán mért optikai jel paramétereinek változásával. Ezt követően megvizsgáltam, hogy az adott optikai jel eltérően változik-e a hippocampusz különböző régióiban. Majd összehasonlítottam az optikai

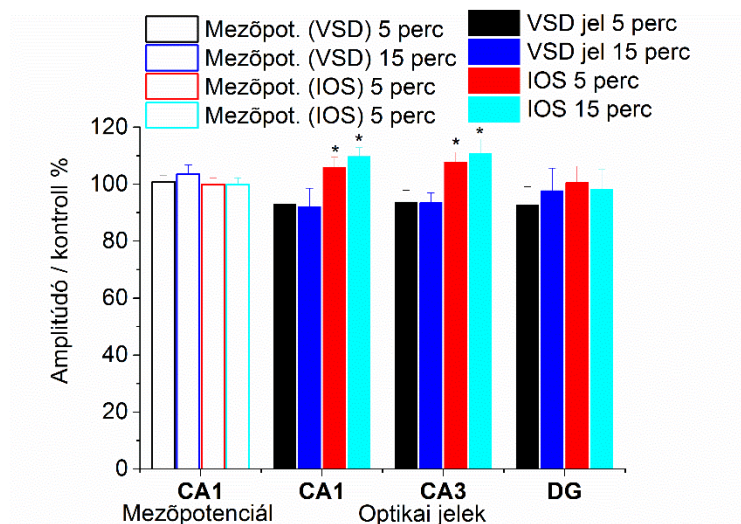
jelek változását a párhuzamosan mért mezőpotenciál jelek paramétereinek változásával. Ez jó referenciaként szolgált, hiszen a mezőpotenciál jelnek minőségileg azonos módon kell változnia azonos inhibitor alkalmazás hatására, viszont a kétféle optikai szignál kiváltásához használt eltérő stimulálási protokollok miatt lehetnek mennyiségi különbségek. Végül, de nem utolsó sorban egymással is összehasonlítottam az azonos régióból mért IOS és VSD jelek változását az adott inhibitor hatására.

#### **4.3.1 Az optikai jelek időbeli stabilitása**

A farmakológiai vizsgálatok megkezdése előtt meg kellett győződnünk a mezőpotenciál jel és az optikai jelek időbeli stabilitásáról, mivel az IOS kiváltásához használt stimulálási protokollal hosszú távú potenciációt (LTP, long term potentiation) lehet kiváltani.

Az 15. ábra mutatja, hogy az IOS-sal és a VSD jellel egy időben mért mezőpotenciál jel amplitúdója, valamint a VSD jel amplitúdója stabil volt, viszont az IOS amplitúdójában kis mértékű (2-8 %-os) szignifikáns növekedést tapasztaltam a CA1 és a CA3 régiókban. Mivel az IOS amplitúdója lineárisan korrelált a többi IOS paraméterrel, azok is hasonló mértékű növekedést mutattak. Ezt a különböző farmakológiai ágensek hatásának vizsgálatakor úgy vettem figyelembe, hogy csak akkor tekintettem a vegyület hatását szignifikánsnak, ha annak mértéke legalább kétszeres volt az alapvonal változásához képest.

A kiértékelés során a kísérleti módszerek fejezetben megjelölt összes paraméterre kiszámoltam az anyagok hatását, de a könnyebb áttekinthetőség kedvéért a mezőpotenciál jel amplitúdóját hasonlítom össze az optikai jelek amplitúdójával a CA1, CA3 és a DG régiókban, és csak ott térek ki az egyes paraméterek értékeinek változására, ahol azok az amplitúdóval való lineáris korrelációból várható viselkedéstől eltértek.



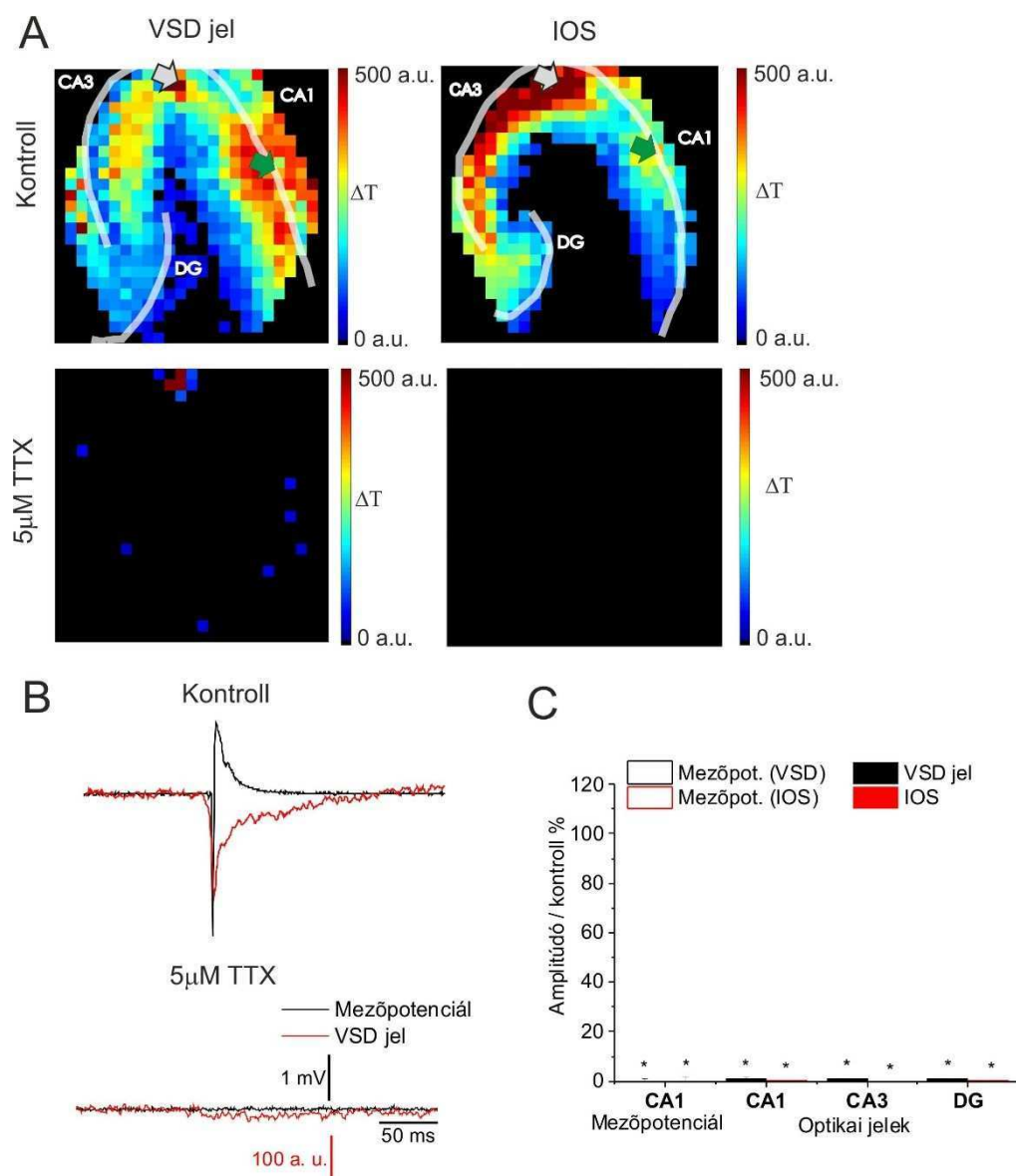
**15. ábra: Mezőpotenciál jel, IOS és VSD jelek amplitúdójának stabilitása.** A CA1 régióban az IOS-sal (Mezőpot. (IOS)) és a VSD jellel (Mezőpot. (VSD)) egy időben mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója stabilitásának összehasonlítása. Az 5 és 15 perc jelöli az inhibitor adagolásának megkezdésétől eltelt időt, ebben az esetben nincs inhibitor, csak mesterséges agyfolyadékot adagoltam. Erre azért volt szükség, hogy lássuk, hogy időben változik-e az adott inhibitor hatása. Az értékek kontroll %-ban vannak megadva. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 6$  az IOS és  $N = 7$  a VSD jelek esetében).

#### 4.3.2 Az idegsejtek aktiválódása szükséges feltétele az optikai jelek kialakulásának

Hogy megvizsgáljam, az általam mért optikai jelek valóban követik-e a Schaffer kollaterálisok stimulálására bekövetkező idegi aktivitást, legátoltam a feszültségfüggő nátrium csatornákat  $5 \mu\text{M}$  tetrodotoxin (TTX) alkalmazásával. A TTX teljes mértékben gátolta a mezőpotenciál jelet (1. táblázat). Ezzel párhuzamosan mind az IOS, mind a VSD jelek (1. táblázat) teljesen eltűntek az összes sejtrétegből (16. ábra). Ez arra utal, hogy a szövetben passzívan terjedő feszültség nem elegendő az optikai jel kiváltásához (szemben a mezőpotenciálon detektálható stimulációs artefaktal), tehát mindkét optikai jel kialakításához szükséges az idegsejtek aktiválódása.

**1. táblázat.**  $5 \mu\text{M}$  TTX hatása az IOS és VSD jelekkel szimultán mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek amplitúdójára kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$  az IOS és  $N = 6$  a VSD jelek esetében).

	Mezőpotenciál jel		Optikai jelek	
	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS
CA1	$0 \pm 1,2^*$	$0 \pm 1,6^*$	$1,0 \pm 0,4^*$	$0,3 \pm 0,3^*$
CA3	-	-	$0,8 \pm 0,3^*$	$0,0 \pm 0,0^*$
DG	-	-	$0,7 \pm 0,4^*$	$0,2 \pm 0,1^*$



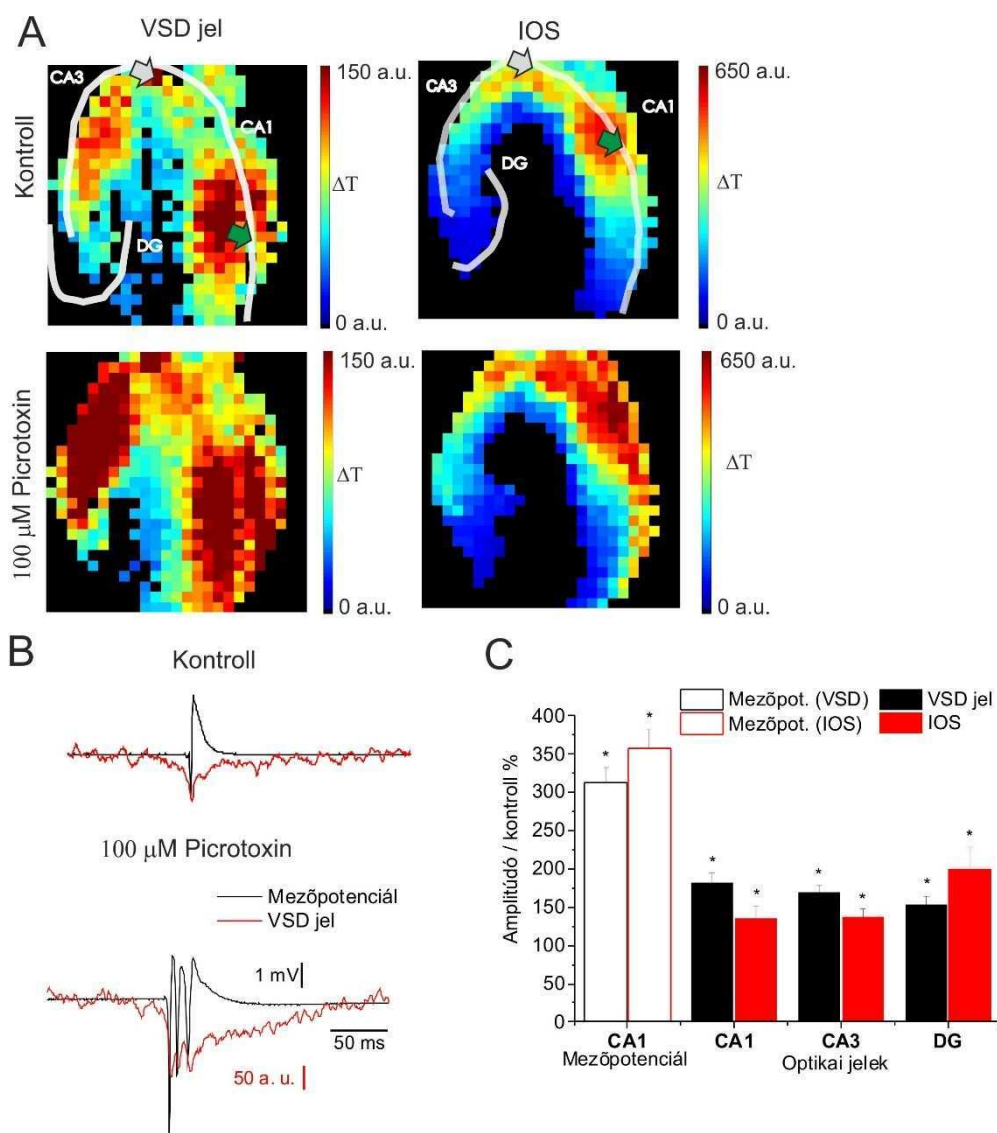
**16. ábra: Az IOS és VSD jelek függése az idegi aktivitástól.** **A:** Reprezentatív IOS és VSD amplitúdó térképek, kontroll körülmények között és 5  $\mu$ M TTX adagolása alatt. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mezőpotenciál elektród helyét zöld nyíl mutatja. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja. **B:** Reprezentatív mezőpotenciál és VSD jel görbék, kontroll körülmények között és 5  $\mu$ M TTX adagolása alatt. **C:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója változásának összehasonlítása 5  $\mu$ M TTX adagolása alatt. Az értékek kontroll %-ban vannak megadva. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$  az IOS és  $N = 6$  a VSD jelek esetében).

Az idegi aktivitás gátlásának hatása után az idegi aktivitás növelésének hatását vizsgáltam a mezőpotenciál jelen és az optikai jeleken. 100  $\mu\text{M}$  picrotoxint, a  $\text{GABA}_A$  receptorok specifikus antagonistáját adagoltam.

A picrotoxin megnövelte mind a mezőpotenciál jel amplitúdóját, mind az IOS és a VSD jel amplitúdóját (2. táblázat) az összes vizsgált régióban. A picrotoxin által kiváltott növekedés a mezőpotenciál jel amplitúdójában nagyobb, mint az optikai jelek amplitúdójában (2. táblázat). A VSD jel integráljának növekedése a CA1-ben azonban hasonló a mezőpotenciál jel amplitúdójának változásához (VSD integrál:  $308 \pm 32$  kontroll %,  $N = 8$ ; IOS integrál:  $170 \pm 32$  kontroll %,  $N = 5$ ). Az IOS szignifikánsan kisebb mértékben növekszik a CA3-ban mint a VSD jel (2. táblázat,  $p < 0,05$ , ANOVA), továbbá a VSD jel amplitúdója nem mutatott szignifikáns különbséget a különböző régiók között, míg az IOS esetében az amplitúdó növekedése a DG-ben szignifikánsan nagyobb volt, mint a CA1-ben és a CA3-ban (egytényezős ANOVA,  $p < 0,05$ ). Az IOS esetében megfigyelhető volt, hogy a növekedés mértéke a CA1-en belül a piramis rétegben és a disztális radiátumban volt a legnagyobb (17. ábra). Az IOS amplitúdójának növekedése a disztális radiátumban valószínűleg az aktiválódott terület növekedésével függ össze, míg a piramis rétegben való növekedése valószínűleg a GABAerg szinapszisoknak a piramis sejtek sejttestein és a proximális apikális dendriteken való gyakori előfordulásával (Benson et al., 1994) hozható összefüggésbe. Ezen eredmények alapján elmondható, hogy mind az IOS, mind a VSD jelek az idegi aktivitást követik.

**2. táblázat.** 100  $\mu\text{M}$  picrotoxin hatása az IOS és VSD jelekkel szimultán mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$  az IOS és  $N = 8$  a VSD jelek esetében).

	Mezőpotenciál jel		Optikai jelek	
	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS
CA1	$311,8 \pm 20,4^*$	$357,1 \pm 25,6^*$	$181,9 \pm 11,6^*$	$135,1 \pm 16,8^*$
CA3	-	-	$168,4 \pm 9,8^*$	$136,6 \pm 10,5^*$
DG	-	-	$153,3 \pm 10,5^*$	$200,4 \pm 27,4^*$



**17. ábra: A GABA<sub>A</sub> receptor gátlása növeli az IOS és VSD jelek amplitúdóját. A:** Reprezentatív IOS és VSD amplitúdó térképek, kontroll körülmények között és 100  $\mu$ M picrotoxin adagolása alatt. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mezőpotenciál elektród helyét zöld nyíl mutatja. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja. **B:** Reprezentatív mezőpotenciál jel és VSD jel görbék, kontroll körülmények között és 100  $\mu$ M picrotoxin adagolása alatt. **C:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója változásának összehasonlítása 100  $\mu$ M picrotoxin adagolása alatt. Az értékek kontroll %-ban vannak megadva. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$  az IOS és  $N = 8$  a VSD jelek esetében).

#### 4.3.3 A glutaminsav receptorok szerepe az IOS és VSD jelek kialakításában

Az AMPA/kainát receptorok gátlása 20  $\mu$ M CNQX adagolásával mindkét optikai jel mérésekor csökkentette a mezőpotenciál jel amplitúdóját (3. táblázat). Ezzel párhuzamosan csökkent az IOS és a VSD jel amplitúdója is (3. táblázat).

**3. táblázat.** 20  $\mu$ M CNQX hatása az IOS és VSD jelekkel szimultán mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$  az IOS és  $N = 8$  a VSD jelek esetében).

	Mezőpotenciál jel		Optikai jelek	
	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS
CA1	13,4 $\pm$ 1,2*	29,2 $\pm$ 3,1*	12,7 $\pm$ 3,5*	31,8 $\pm$ 4,5*
CA3	-	-	35,9 $\pm$ 8,5*	49,3 $\pm$ 8,5*
DG	-	-	31,2 $\pm$ 12,7*	48,6 $\pm$ 6,2*

A mezőpotenciál jel amplitúdójának csökkenése összhangban van az optikai jelek amplitúdójának csökkenésével. Az IOS amplitúdójának csökkenése a leglátványosabb a CA1-en belül abban a régióban volt, ahol a Schaffer kollaterálisok végződnek (18. ábra). Érdeemes megjegyezni, hogy a CNQX csökkentette az IOS görbe meredekségét ( $63 \pm 8$  kontroll %-ra), viszont a lecsengését nem befolyásolta, ami arra utalhat, hogy a CNQX szelektíven az IOS kialakulását elősegítő folyamatra hat, míg a lecsengéséért felelős folyamatokat nem befolyásolja.

Az AMPA/kainát és NMDA receptorok együttes gátlása 20  $\mu$ M CNQX és 100  $\mu$ M APV adagolásával, tovább csökkentette az IOS-nál mért mezőpotenciál jel amplitúdóját (4. táblázat), míg a VSD jel esetében a mezőpotenciál jel nem csökkent tovább a csak CNQX adagoláshoz képest.

**4. táblázat.** 20  $\mu$ M CNQX és 100  $\mu$ M APV együttes hatása az IOS és VSD jelekkel szimultán mért mezőpotenciál és az optikai jelek amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$  az IOS és  $N = 8$  a VSD jelek esetében).

	Mezőpotenciál jel		Optikai jelek	
	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS
CA1	11,9 $\pm$ 1,2*	6,5 $\pm$ 0,7*	7,4 $\pm$ 1,9*	15,8 $\pm$ 5,9*
CA3	-	-	32,0 $\pm$ 6,7*	23,4 $\pm$ 10,1*
DG	-	-	32,3 $\pm$ 11,8*	22,8 $\pm$ 5,5*

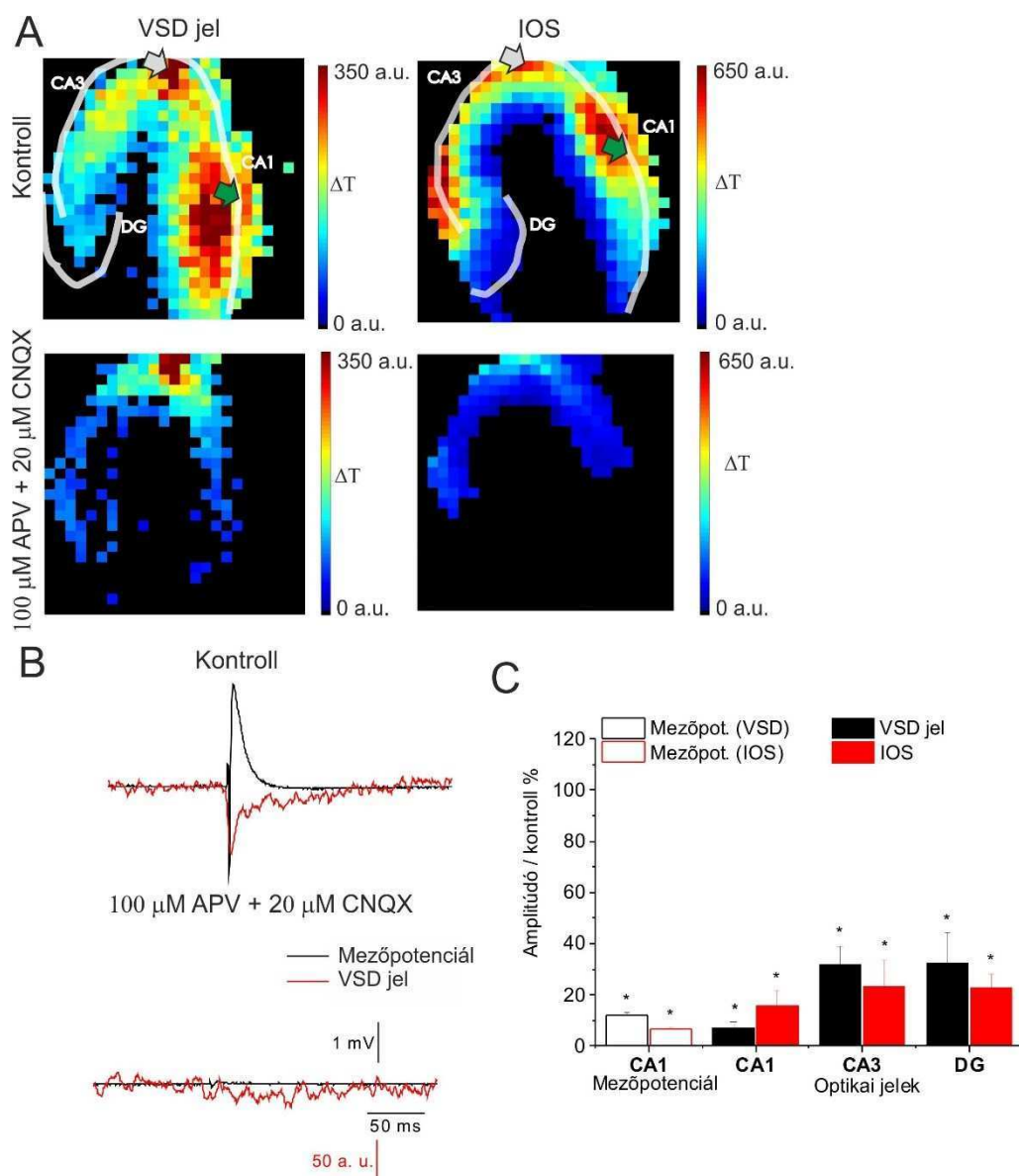
Ez magyarázható azzal, hogy a VSD jel kiváltásához használt enyhébb elektromos stimulálás nem elegendő az NMDA receptorok aktiválódásához. Ugyanezt figyelhetjük meg az optikai szignálok amplitúdójánál: az IOS amplitúdója tovább csökkent az AMPA/kainát gátláshoz képest (a CA1-ben  $16 \pm 6$  %-kal, a CA3-ban  $27 \pm 10$  kontroll %-kal,  $N = 5$ ), a VSD jel amplitúdója nem csökkent tovább. Egyik optikai jelnél sem volt megfigyelhető az egyes régiók

között különbség, de az IOS és VSD arányában szignifikáns különbség volt a kontrollhoz képest (2. melléklet). Ezt azt mutatja, hogy a glutaminsav receptorok gátlásának hatására az IOS és a VSD jelek különböző mértékben változnak az egyes régiókban. Ez azt jelzi, hogy az glutaminsav receptorok hozzájárulása az IOS és VSD jelek kialakításához a különböző régiókban eltérő lehet.

Mivel az NMDA receptorokat blokkoló  $Mg^{2+}$  eltávolítása általában az AMPA receptorok aktiválódásához kötött (Mayer et al., 1984; Verkhratsky és Steinhäuser, 2000; Deitmer és Rose, 2010) és a gliasejteken membránjában lévő NMDA receptorok csak kis mértékben érzékenyek a  $Mg^{2+}$  blokkoló hatására (Verkhratsky és Steinhäuser, 2000; Deitmer és Rose, 2010), a tény hogy az APV tovább csökkentette az IOS amplitúdóját utalhat a gliális  $Mg^{2+}$ -független NMDA receptorok (Verkhratsky és Steinhäuser, 2000; Deitmer és Rose, 2010) hozzájárulására az IOS kialakításában.

Összességében elmondható, hogy mindkét optikai jel nagyobb része (70 %-a) a posztzinaptikus glutamáterg receptorok aktiválódásához kötött. Továbbá meg kell jegyezni, hogy az optikai jelek 7-32 %-át nem gátolta a CNQX és APV együttes adagolása sem. A fennmaradó optikai jel mutathatja a preszinaptikus aktivitást, ahogy azt Andrew és MacVicar is megfigyelték (Andrew és MacVicar, 1994) vagy lehet GABA<sub>erg</sub> aktivitás, illetve lehet gliális aktivitás következménye is.





**18. ábra: Az ionotróp glutaminsav receptorok gátlása csökkenti az IOS és VSD jeleket. A:** Reprezentatív IOS és VSD amplitúdó térképek, kontroll körülmények között és 100 μM APV és 20 μM CNQX adagolása alatt. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mezőpotenciál elektród helyét zöld nyíl mutatja. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja. **B:** Reprezentatív mezőpotenciál és VSD jel görbék, kontroll körülmények között és 100 μM APV és 20 μM CNQX adagolása alatt. **C:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója változásának összehasonlítása 100 μM APV és 20 μM CNQX adagolása alatt. Az értékek kontroll %-ban vannak megadva. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$  az IOS és  $N = 8$  a VSD jelek esetében).

#### 4.3.4 Az asztroglialis glutaminsav transzport szerepe az IOS és VSD jelek kialakításában

A gliális glutaminsav felvételnek az IOS és a VSD jelek kialakításában játszott szerepének vizsgálatához 300  $\mu$ M dihidrokainsavat (DHK) alkalmaztam. A DHK az asztrocitákon specifikusan kifejeződő, a hippocampusban a glutaminsav felvétel döntő részéért felelős (Danbolt, 2001) 2-es típusú serkentő aminosav transzporter (EAAT2 – excitatory amino acid transporter 2) specifikus gátlószere.

**5. táblázat.** 300  $\mu$ M DHK adagolás hatása 5 és 15 perc adagolást követően az IOS és VSD jelekkel szimultán mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 7$  az IOS és  $N = 7$  a VSD jelek esetében).

	300 $\mu$ M DHK/5 perc				300 $\mu$ M DHK/15 perc			
	Mezőpotenciál jel		Optikai jelek		Mezőpotenciál jel		Optikai jelek	
	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS
CA1	131,8 $\pm$ 5,5*	113,6 $\pm$ 5,9*	69,4 $\pm$ 2,1*	53,5 $\pm$ 7,8*	82,0 $\pm$ 4,5*	73,6 $\pm$ 8,7*	53,6 $\pm$ 5,6*	34,5 $\pm$ 6,8*
CA3	-	-	19,3 $\pm$ 1,4*	38,2 $\pm$ 3,9*	-	-	14,5 $\pm$ 1,5*	28,2 $\pm$ 7,6*
DG	-	-	10,1 $\pm$ 2,0*	31,2 $\pm$ 6,3*	-	-	10,2 $\pm$ 3,2*	21,5 $\pm$ 6,5*

A DHK adagolás első 5 percében a mezőpotenciál jel amplitúdója (5. táblázat) és a PS amplitúdója (141 $\pm$ 19 %-ra az IOS  $N = 7$  és 144 $\pm$ 8 kontroll %-ra a VSD jel esetében,  $N = 7$ ) nőtt, viszont a fEPSP meredeksége (61 $\pm$ 5 %-ra az IOS  $N = 7$  és 75 $\pm$ 3 kontroll %-ra a VSD jel esetében  $N = 7$ ) és a mezőpotenciál jel magassága (84 $\pm$ 6 %-ra az IOS  $N = 7$  és 95 $\pm$ 2 kontroll %-ra a VSD jel esetében  $N = 7$ ) csökkent.

A PS és a mezőpotenciál jel amplitúdójának növekedése magyarázható azzal, hogy a DHK által megnövelt extracelluláris glutaminsav koncentráció (Massieu et al., 1995; Nyitrai et al., 2006) következtében az idegsejtek tüzelési rátája (White et al., 1994) és az ingerlésre való válaszadási valószínűsége megnövekedett (Mayer et al., 1984). Ezzel szemben mind az IOS, mind a VSD jelek amplitúdója csökkent a hippocampusz összes régiójában (5. táblázat).

Ez utalhat arra, hogy az asztrociták glutaminsav felvétele közvetlenül hozzájárul az IOS és VSD jelek kialakításához. Az, hogy az IOS mellett a VSD jel amplitúdója is csökkent a CA1 teljes területére vonatkoztatva, miközben a CA1 egy adott pontján mért mezőpotenciál növekedett, jelezheti azt, hogy a piramis rétegben elhelyezett egy darab mérőelektrodon mért mezőpotenciál nem jellemzi megfelelően a teljes CA1 régióban lévő idegi aktivitást. Ezért kiszámoltam a mérőelektrod közvetlen közelében lévő diódán is az IOS és a VSD jelek

változását és azt tapasztaltam, hogy mindkét esetben szignifikánsan csökkent az optikai jel (az IOS  $56 \pm 11$  %-ra  $p < 0,001$ , a VSD  $84 \pm 3$  kontroll %-ra  $p < 0,001$  Mann-Whitney teszt). Ez arra utal, hogy nemcsak az IOS, de a VSD jel kialakításában is közvetlenül részt vesz az EAAT2 transzporterén keresztüli gliális glutaminsav felvétel. Mivel a VSD jel maximumát 6 ms-on belül éri el, ezért ennek a transzport folyamatnak már ezen a rövid időskálán (Tzingounis és Wadiche, 2007; Dallérac et al., 2013; Sibille et al., 2014) is szerepe lehet a VSD jel kialakításában, ellentétben Kojima és munkatársai állításával, akik csak a VSD jel lassú komponensével ( $>10$  ms) azonosítják a gliális glutaminsav transzportot (Kojima et al., 1999). Az EAAT2 transzporter hozzájárulását a VSD jel lassú komponenséhez én is megfigyeltem, mivel DHK adagolás alatt  $49 \pm 4$  kontroll %-kal csökkent a VSD jel integrálja.

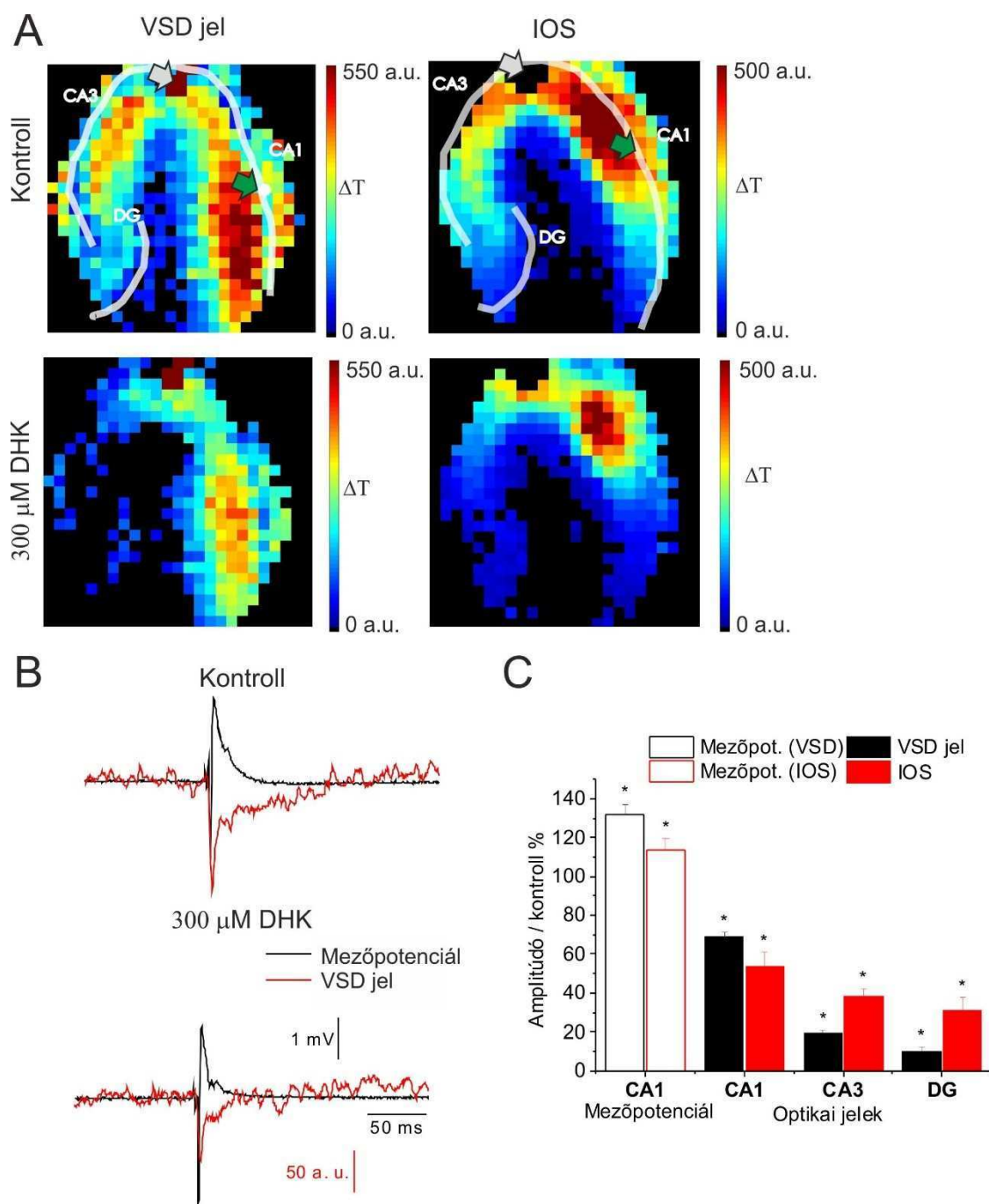
Mind az IOS, mind a VSD jel esetében a mezőpotenciál jel és a PS amplitúdójának változásával ellentétesen, viszont a fEPSP meredekségével azonos irányban változik az optikai jelek amplitúdója. Ez azt mutatja, hogy megszűnik a sejtek tüzelésének mértéke (PS amplitúdó) és az optikai jelek amplitúdója közötti lineáris összefüggés. Erre utal az is, hogy a VSD/FP és az IOS/FP amplitúdó hányadosok is szignifikánsan különböznek a kontrolltól ( $0,5 \pm 0,1$  az IOS  $0,5 \pm 0,0$  a VSD jel esetében  $N = 7$ ). Ezzel szemben a szinaptikus aktivitást jelző fEPSP meredekség és az optikai jelek amplitúdója között fennmarad a lineáris összefüggés. Ez azt jelentheti, hogy az IOS és a VSD jelek jobban korrelálnak a szinaptikus aktivitás mértékével, mint a sejtek tüzelési aktivitásával.

A gliális glutaminsav felvételének hozzájárulását az IOS kialakításához támogatja az a megfigyelés is, hogy az IOS csökkenése a CA1-en belül legnagyobb mértékű a stratum radiatum-ban volt (19. ábra), ahol a glia/neuron arány is a legmagasabb. Érdekes, hogy az IOS esetében nem volt szignifikáns különbség a különböző régiók között, míg a VSD esetében az összes vizsgált régióban szignifikánsan különbözött egymástól a DHK hatás (egytényezős ANOVA,  $p < 0,05$ , 19. ábra). A legnagyobb különbség a CA1 és a CA3 között volt megfigyelhető ( $50 \pm 2$  kontroll %). Ez a különbség adódhat az EAAT2 fehérje eltérő kifejeződéséből a CA1 és CA3 régiókban vagy az aktiválódás különbségéből (orto- versus antidromikus). Az IOS és a VSD jel amplitúdó hányadosa szintén szignifikáns különbséget mutatott a CA3-ban és a DG-ben a kontrollhoz képest ( $2,0 \pm 0,3$  a CA3-ban,  $5,7 \pm 2,0$  a DG-ben).

A DHK adagolás következő tíz percében a mezőpotenciál jel összes paramétere csökkent: a mezőpotenciál jel amplitúdója (5. táblázat), a PS amplitúdója ( $73 \pm 7$  %-ra az IOS  $N = 7$  és  $64 \pm 4$  kontroll %-ra a VSD jel esetében,  $N = 7$ ), az fEPSP meredeksége ( $42 \pm 4$  %-ra az IOS  $N = 7$  és  $56 \pm 4$  kontroll %-ra a VSD jel esetében  $N = 7$ ) és a mezőpotenciál jel magassága ( $71 \pm 12$  %-ra az IOS  $N = 7$  és  $68 \pm 2$  kontroll %-ra a VSD jel esetében  $N = 7$ ). Ezzel

párhuzamosan az IOS amplitúdója tovább csökkent az 5 perces adagoláshoz képest valamennyi régióban (5. táblázat), a VSD jel pedig a CA1-ben és a CA3-ban tovább csökkent (ANOVA,  $p < 0,05$ ), a DG-ben nem változott (5. táblázat, ANOVA,  $p > 0,05$ ).

A mezőpotenciál jel paramétereinek csökkenését magyarázhatja: i) az idegsejteken található glutaminsav receptorok deszenzitizációja a megnövekedett extracelluláris glutaminsav koncentráció következtében (Palmer et al., 2003; Lozovaya et al., 2004; Nyitrai et al., 2010), ii) a feszültségfüggő nátrium csatornák részleges inaktiválódása (Stühmer et al., 1989), iii) a glutaminsav mediálta áramok intenzitásának csökkenése (Grewer et al., 2008) iv) a neuronok hosszú távú duzzadása, melynek következtében az alapvonal változik meg (Choi et al., 1987; Choi és Rothman, 1990).



**19. ábra: Az asztrociták glutaminsav transzportjának gátlása csökkenti az IOS és VSD jeleket.** **A:** Reprezentatív IOS és VSD amplitúdó térképek, kontroll körülmények között és 5 perces 300  $\mu$ M DHK adagolása alatt. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mezőpotenciál elektród helyét zöld nyíl mutatja. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja. **B:** Reprezentatív mezőpotenciál jel és VSD jel görbék, kontroll körülmények között és 5 perces 300  $\mu$ M DHK adagolása alatt. **C:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója változásának összehasonlítása 5 perces 300  $\mu$ M DHK adagolása alatt. Az értékek kontroll %-ban vannak megadva. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 7$  az IOS és  $N = 7$  a VSD jelek esetében).

Annak érdekében, hogy megvizsgáljam, vajon a DHK azért csökkenti-e az IOS-t, mert a sejtek már eleve duzzadt állapotban vannak az ingerléskor, kiszámoltam az alapvonalis fényintenzitás (RLI – resting light intensity) változásának mértékét a két DHK adagolási pontban (5 és 15 perc adagolás után). Ez mindkét pontban szignifikánsan változott, az első 5 percben  $107 \pm 2$  kontroll %-ra nőtt ( $N = 7$ ), majd a következő 10 percben tovább növekedett  $112 \pm 2$  kontroll %-ra ( $N = 7$ ). Az alapvonalis fényintenzitás változása azt mutatja, hogy az IOS kialakításában szerepet játszik az alapvonalis sejtduzzadás, de a DHK hatásához képest ez sokkal kisebb, tehát teljes egészében nem magyarázhatja azt. A CA1-ben az IOS és a VSD jelek amplitúdója, valamint az fEPSP meredeksége szinte azonos mértékben csökkent ( $19 \pm 3$  %-kal az IOS  $N = 7$ ,  $15 \pm 6$  %-kal az VSD jelek amplitúdója  $N = 7$  és  $19 \pm 3$  %-kal az fEPSP meredekség az IOS-nál  $N = 7$ ,  $19 \pm 4$  %-kal az fEPSP meredekség a VSD-nél  $N = 7$ ), így az optikai jelek amplitúdójának további csökkenése lehet az fEPSP meredekség csökkenésének következménye is.

A DHK hatása visszafordítható volt, a jelek 70 %-ban regenerálódtak 15 perc kimosás után, így az excitotoxicitás következtében fellépő neuron pusztulást kizárható, mint az optikai jelek és mezőpotenciál jel paraméterek csökkenésének okozója.

DHK, APV és CNQX együttes adagolásával azt vizsgáltam, hogy az IOS komponens ami APV és CNQX mellett is jelen volt vajon származhat-e preszinaptikus idegsejtek által kibocsájtott glutaminsav felvételéből. A három vegyület együttes adagolása nem csökkentette tovább sem az IOS amplitúdóját, sem a mezőpotenciál jel paramétereit ( $24 \pm 1$  %,  $0 \pm 1$  % és  $7 \pm 1$  kontroll % IOS amplitúdó, PS amplitúdó és az fEPSP meredeksége esetében,  $N=5$ ) az APV és CNQX adagolásához képest. Ez arra enged következtetni, hogy az IOS kialakításában részt vehetnek nem glutamaterg pályák is, mint például a neuronok aktivitása közben kibocsájtott ATP mediálta sejtduzzadás (Fields és Ni, 2010).

Összességében elmondható, hogy a glutaminsav receptor gátló vegyületekkel ellentétben az EAAT2 transzporter gátlása ellenkező irányba változtatta a mezőpotenciál jel paramétereit és az optikai jelek amplitúdóját.

#### **4.3.5 A $K^+/Cl^-$ kotranszport szerepe az optikai jelek kialakításában**

A  $K^+/Cl^-$  kotranszporter (KCC2)  $Cl^-$  és  $K^+$  ionokat transzportál a sejt belsejéből a sejtközi térbe, és igen fontos szerepet játszik az idegsejtek intracelluláris kloridion koncentrációjának fenntartásában (Balena et al., 2008). A neuronális KCC2 (Kahle et al., 2008) kotranszporterrel szemben a  $Na^+/K^+/Cl^-$  kotranszporter (NKCC1) főként az asztrocitákon fejeződik ki és  $Na^+$ ,  $K^+$  és  $Cl^-$  ionokat transzportál a sejt belsejébe (Deitmer és Rose, 2010).

Emellett fontos szerepet játszik a neuronok aktiválódása után a  $K^+$  eltávolításában az extracelluláris térből ( $K^+$  clearance) (Hertz et al., 2013). A két transzporter aktivitásának egyensúlya szükséges a felnőtt idegrendszerben a gátló szinaptikus aktivitás fenntartásához (Kahle et al., 2008). A nem specifikus NKCC1 inhibitor furoszemid IOS-t drasztikusan csökkentő hatása alapján a NKCC1-t gondolják az IOS kialakításában részt vevő egyik fő fehérjének (MacVicar és Hochman, 1991; Andrew et al., 1999). A furoszemidről azonban ismert, hogy egyaránt gátolja az NKCC1-et és a KCC2-t is.

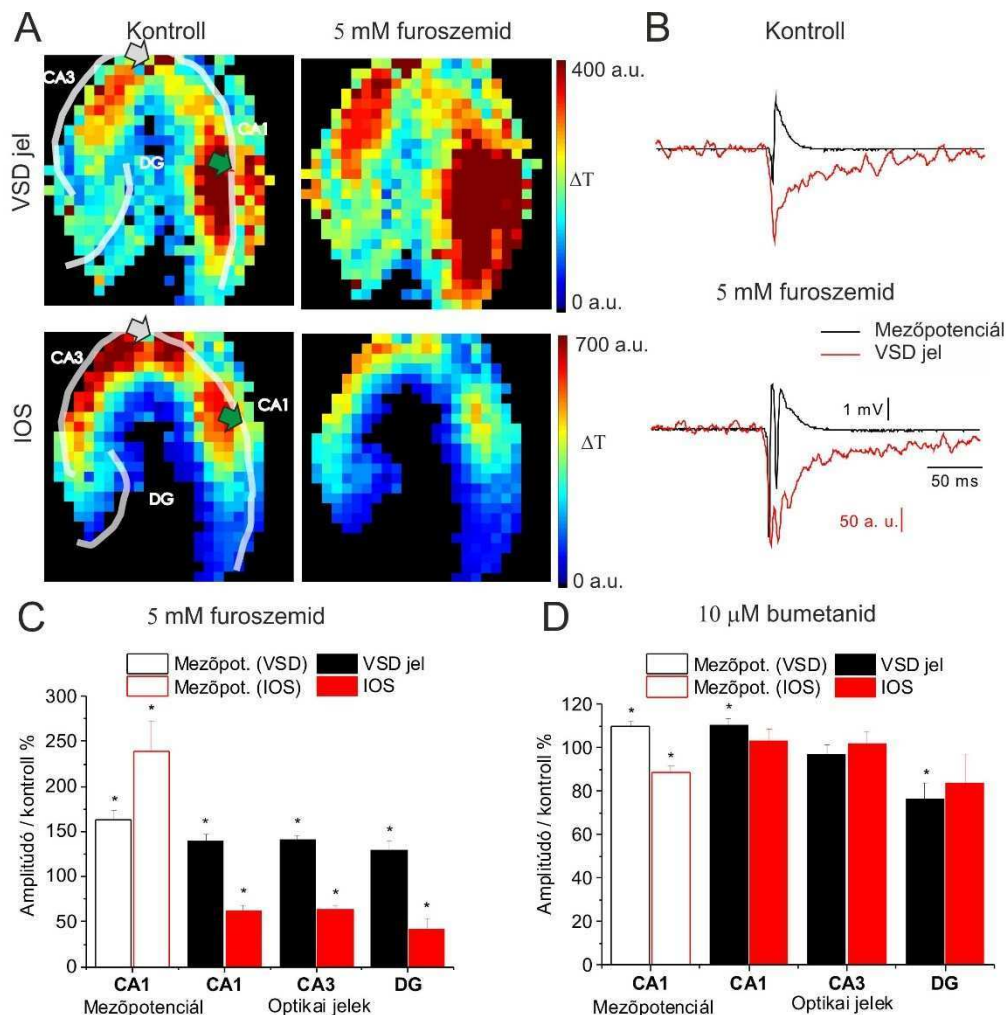
**6. táblázat.** 5 mM furoszemid hatása 5 perc és 15 perc adagolás után az IOS és VSD jelekkel szimultán mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 8$  az IOS és  $N = 6$  a VSD jelek esetében).

	5 mM furoszemid 5 perc				5 mM furoszemid 15 perc			
	Mezőpotenciál jel		Optikai jelek		Mezőpotenciál jel		Optikai jelek	
	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS
CA1	163,6±8,9*	238,5±33,8*	140,0±6,3*	62,5±6,3*	67,9±6,6*	83,4±14,8*	132,3±10,0*	27,2±2,9*
CA3	-	-	140,6±5,1*	64,1±4,5*	-	-	136,9±6,4*	23,1±5,6*
DG	-	-	128,9±10,2*	41,2±11,5*	-	-	107,5±12,4*	16,8±5,9*

Az általam végzett kísérletekben a furoszemid (5 mM) az adagolás első 5 percében növelte a mezőpotenciál jel (6. táblázat) és a PS amplitúdóját ( $266 \pm 37$  %-ra az IOS  $N = 8$  és  $192 \pm 16$  kontroll %-ra a VSD jel esetében,  $N = 6$ ), viszont a fEPSP meredekségét csökkentette ( $83 \pm 8$  %-ra az IOS,  $N = 8$  és  $67 \pm 8$  kontroll %-ra VSD jel esetében,  $N = 6$ ). Az idegsejtek tüzelésének megnövekedett mértéke fakadhat a furoszemid gátló hatásából az  $\alpha 6$  típusú  $GABA_A$  receptoron, illetve a kloridion gradiens megváltozásából adódó  $GABA_A$  receptor mediálta gátló funkció leromlása miatt (Korn et al., 1987), illetve a  $K^+$  lecsökkent koncentráció gradiense (Traynelis és Dingledine, 1988) is okozhatja. A mezőpotenciál jel és a PS amplitúdójának növekedésével párhuzamosan a VSD jel amplitúdója is nőtt az összes vizsgált régióban (6. táblázat). Ezzel szemben az IOS amplitúdója csökkent (6. táblázat), legszembetűnőbben a stratum radiatumban (20. ábra). Érdeemes megjegyezni, hogy az IOS lecsengését a furoszemid jobban csökkentette, mint a meredekségét ( $50 \pm 7$  %-ra a lecsengést és  $58 \pm 7$  kontroll %-ra a meredekséget a CA1 régióban), ami arra utalhat, hogy a furoszemid az IOS lecsengésben részt vevő folyamatra hathat.

Egyik optikai jel sem mutatott szignifikáns különbséget az egyes régiók között a furoszemid jelenlétében, ami összhangban van a kotranszporterek egyenletes eloszlásával a hippocampusban (Gulyás et al., 2001). Az IOS és a VSD jelek amplitúdóinak különböző irányba történő változása arra utal, hogy egy furoszemidre érzékeny folyamat fontos szerepet játszik az IOS kialakításában a neuronális aktivitástól függetlenül. IOS-nál megszűnt, míg a

VSD jelnél megmaradt a mezőpotenciál jel és az optikai jel amplitúdója közötti összefüggés, ezt az IOS amplitúdó/mezőpotenciál jel amplitúdó arány kontrolltól való eltérése is mutatja ( $0,5 \pm 0,1$ ). Az IOS és a VSD jel amplitúdóinak aránya is szignifikánsan különbözik az összes vizsgált régióban ( $0,5 \pm 0,1$ ,  $0,5 \pm 0,0$  és  $0,3 \pm 0,1$  a CA1, a CA3 és a DG régiókban).



**20. ábra: Az asztroglialis NKCC1 és a neuronális KCC2 együttes gátlása furoszemiddel a VSD jelet növeli, míg az IOS-t csökkenti, míg az NKCC1 gátlása bumetaniddal kis mértékben növeli az VSD jelet, míg az IOS-ra nem hat. A:** Reprezentatív IOS és VSD amplitúdó térképek, kontroll körülmények között és 5 mM furoszemid adagolása alatt. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mezőpotenciál elektród helyét zöld nyíl mutatja. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja. **B:** Reprezentatív mezőpotenciál jel és VSD jel görbék, kontroll körülmények között és 5 mM furoszemid adagolása alatt. **C:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója változásának összehasonlítása 5 mM furoszemid adagolása alatt. **D:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója változásának összehasonlítása 10  $\mu$ M bumetanid adagolása alatt. Az értékek kontroll %-ban vannak megadva. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól (alatt  $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt, a furoszemid 5 perces adagolása  $N = 8$  az IOS és  $N = 6$  a VSD jelek esetében, a bumetanid adagolása  $N = 5$  az IOS és  $N = 7$  a VSD jelek esetében).



További 10 perc furoszemid adagolás után a mezőpotenciál jel összes paramétere csökkent. A mezőpotenciál jel (6. táblázat) és a PS amplitúdó  $43 \pm 5$  kontroll %-ra az IOS és  $77 \pm 9$  kontroll %-ra a VSD jel esetében, az fEPSP meredeksége  $44 \pm 5$  kontroll %-ra az IOS, és  $35 \pm 5$  kontroll %-ra VSD jel esetében, a mezőpotenciál jel magassága pedig  $43 \pm 7$  kontroll %-ra az IOS és  $48 \pm 4$  kontroll %-ra VSD jel esetében. A mezőpotenciál jel paramétereinek csökkenésének hátterében állhat, hogy a megváltozott kloridion gradiens befolyásolja a glutaminsav szinaptikus vezikulákba történő visszavételét (Otis, 2001). A mezőpotenciál jel csökkenését okozhatja továbbá a stimulálással kiváltott extracelluláris  $[K^+]$  emelkedés mérséklődése (Gutschmidt et al., 1999). Ezzel párhuzamosan az IOS amplitúdója tovább csökkent az előző adagolási ponthoz képest (6. táblázat  $N = 8$ ), viszont a VSD amplitúdója magasabb maradt, mint a kontroll (6. táblázat  $N = 6$ ). A 15 perces kimosási periódus után mind a mezőpotenciál jel, mind az optikai jelek nagy része regenerálódott, ez alapján a neuronok pusztulása kizárható.

A korábbi irodalomban az feltételezték, hogy a furoszemid az NKCC1 gátlásával fejt ki hatását, mivel az NKCC1 gátlása csökkenti a gliasejtek duzzadását (MacVicar és Hochman, 1991; Macvicar et al., 2002) és a gliasejtek  $K^+$  pufferelesét (Kimelberg és Frangakis, 1985).

**7. táblázat.** 10  $\mu$ M bumetanid hatása az IOS és VSD jelekkel szimultán mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$  az IOS és  $N = 7$  a VSD jelek esetében).

	Mezőpotenciál jel		Optikai jelek	
	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS
CA1	$110,1 \pm 2,0^*$	$88,9 \pm 2,5^*$	$110,4 \pm 3,1^*$	$103,5 \pm 5,1$
CA3	-	-	$97,3 \pm 4,0$	$102,0 \pm 5,4$
DG	-	-	$76,7 \pm 6,9^*$	$84,0 \pm 13,0$

Ennek ellenére 10  $\mu$ M bumetanid, az NKCC1 specifikus gátlószere nem volt hatással az IOS amplitúdójára egyik vizsgált régióban sem (7. táblázat), viszont az IOS-sal párhuzamosan mért mezőpotenciál jel amplitúdóját és a PS amplitúdóját szignifikánsan csökkentette ( $89 \pm 3$  és  $80 \pm 4$  kontroll %-ra,  $N=5$ ). Az IOS amplitúdója a mérőelektrod mellett sem csökkent ( $94 \pm 3$  kontroll %). A mezőpotenciál jelre gyakorolt hatás magyarázható az NKCC1 gátlása miatti  $Cl^-$  megfordulási potenciál változásával, ami megnövekedett GABAerg gátlás hatékonyságot eredményez (Dzhala et al., 2005).

Az IOS-sal ellentétben a VSD jel amplitúdója 10  $\mu$ M bumetanid hatására a CA1-ben nőtt, a CA3-ban nem változott, míg a DG-ben szignifikánsan csökkent (7. táblázat). A CA1-

ben mért VSD jel amplitúdójának változásával párhuzamosan nőtt a mezőpotenciál jel amplitúdója is (7. táblázat). Az IOS-nál látottakkal ellentétben a mezőpotenciál jel amplitúdója és a VSD amplitúdója azonos irányban változik a CA1-ben, ezért lehet, hogy a VSD jel és az idegi aktivitás változása közötti összefüggést a bumetanid nem bontja meg. A CA3-ban és a DG-ben nem mértem mezőpotenciál jelet, így ezekben a régiókban elképzelhető, hogy az a VSD jellel párhuzamosan változik. Mivel a VSD jel és a mezőpotenciál jel amplitúdóját a jelek 5-10 ms-on belüli része határozza meg, ezért ez utalhat arra, hogy a VSD jel és a mezőpotenciál jel gyors komponensének kialakításában nincs jelentős szerepe az NKCC1-nek. Sem az optikai jelek/mezőpotenciál jel amplitúdó hányadosok, sem az IOS/VSD amplitúdójának hányadosa nem tért el szignifikánsan a kontrolltól ( $0,9 \pm 0,0$ ,  $1,1 \pm 0,1$  és  $1,1 \pm 0,1$  a CA1-ben, CA3-ban és a DG-ben,  $N = 7$ ). Érdekes megjegyezni ugyanakkor, hogy a VSD jel integrálja mindhárom vizsgált régióban szignifikánsan csökkent ( $89 \pm 3$ ,  $67 \pm 6$  és  $78 \pm 8$  kontroll %-ra a CA1-ben, CA3-ban és a DG-ben,  $N = 7$ ). Mivel a VSD jel integráljának jelentős részét teszi ki a lassú ( $> 10$  ms) komponens, a VSD jel integráljának csökkenése arra utalhat, hogy a VSD jel lassú komponensében szerepe van az asztrociták NKCC1-en keresztüli  $K^+$  pufferekésének, illetve depolarizációjának. Az IOS és VSD kísérletekben detektált mezőpotenciál jel amplitúdójában mért eltérő irányú változás hátterében valószínűleg az eltérő stimulálási protokoll áll.

Mivel az NKCC1 specifikus gátlószere az IOS amplitúdóját nem változtatta meg, míg a VSD jel amplitúdójának változása követte a mezőpotenciál jel amplitúdójának változását, levonhatjuk a következtetést, hogy a NKCC1 egyik optikai szignál kialakításában sem vesz részt a patkány hippocampusz szeletekben.

#### **4.3.6 Az asztrociták $K^+$ felvételének szerepe az IOS és a VSD jelek kialakításában**

A korábbi munkák azt feltételezték, hogy az IOS a glia sejtek  $K^+$  felvételének és az azzal asszociált sejtduzzadásnak feleltethető meg (Holthoff és Witte, 1996; Macvicar et al., 2002). A furoszemidről, ami a KCC2-t és NKCC1-t egyaránt gátolja, azt feltételezték, hogy hatását az NKCC1-en keresztül fejti ki gátolva az asztrociták  $K^+$  és víz felvételét. Mivel a bumetanid, az NKCC1 szelektív gátlószere nem hatott az IOS-ra, ezért a furoszemid valószínűleg a KCC2 gátlásán keresztül hat. Gutschmidt és munkatársai kimutatták, hogy a furoszemid csökkenti a stimulálással kiváltott kálium koncentráció növekedést a sejtközötti térben (Gutschmidt et al., 1999). Ez felveti, hogy más, a  $K^+$  felvételben szerepet játszó fehérjék is részt vehetnek az IOS kialakításában. Arról is vannak korábbi eredmények rája agyszeletben (Konnerth et al., 1987), hogy az IOS mellett a VSD jel kialakításában is részt vesz a  $K^+$  felvétel. Ezért megvizsgáltam a  $K^+$  felvételben jelentős szerepet játszó membránfehérjék közül a  $K_{ir4.1}$  inward rectifier kálium

csatorna és a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPáz gliális  $\alpha 2$  altípusának (Djukic et al., 2007; Macaulay és Zeuthen, 2012; Larsen et al., 2014) szerepét az IOS és a VSD jelek kialakításában.

Elsőként a  $\text{K}_{\text{ir}4.1}$  inward rectifier kálium csatorna nem specifikus gátlószerének, 500  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$ -nak (Walz et al., 1984; Kivi et al., 2000) hatását vizsgáltam a mezőpotenciál jel és az optikai jelek paraméterein. Azért választottam ezt a nem specifikus gátlószert, mert jelenleg a  $\text{K}_{\text{ir}4.1}$  inward rectifier kálium csatornának nincs szelektív gátlószere (Kew és Davies, 2009; Hibino et al., 2010) és az irodalomban leggyakrabban a  $\text{BaCl}_2$ -ot használják gátlószerként (Larsen et al., 2014).

**8. táblázat.** 500  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$  hatása az IOS és VSD jelekkel szimultán mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$  az IOS és  $N = 8$  a VSD jelek esetében).

	Mezőpotenciál jel		Optikai jelek	
	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS
CA1	185,4 $\pm$ 10,9*	135,9 $\pm$ 7,6*	96,9 $\pm$ 11,1	124,7 $\pm$ 7,0*
CA3	-	-	70,6 $\pm$ 4,6*	107,9 $\pm$ 7,3
DG	-	-	44,6 $\pm$ 5,6*	101,3 $\pm$ 7,8

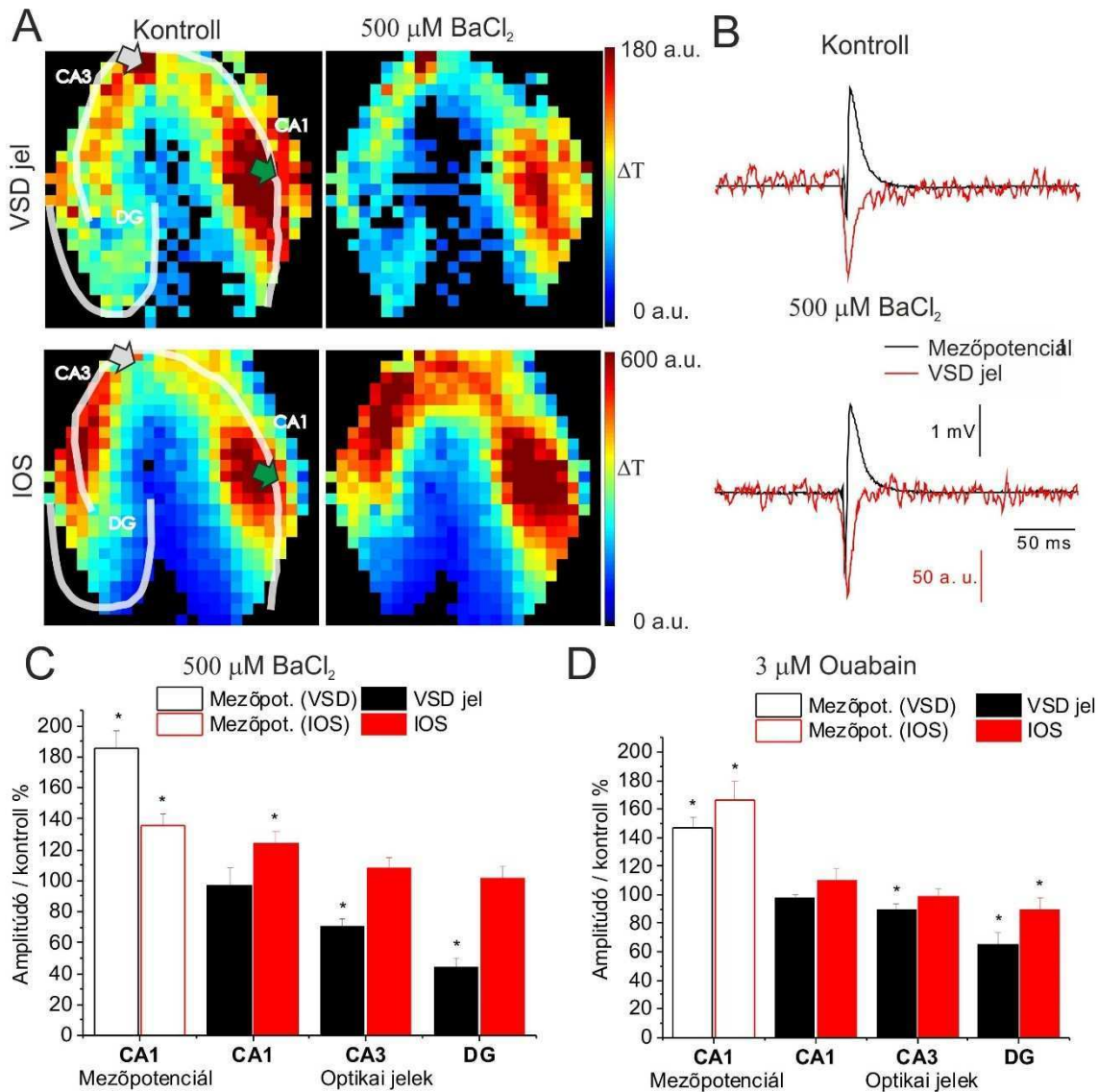
A  $\text{BaCl}_2$  növelte a mezőpotenciál jel amplitúdóját (8. táblázat, 21. ábra). Az IOS amplitúdója szintén nőtt a CA1 régióban (8. táblázat), de a CA3-ban és a DG-ben (8. táblázat) nem tért el szignifikánsan a kontrolltól.

A VSD jel amplitúdója a teljes CA1-en belül nem nőtt szignifikánsan (97 $\pm$ 11 kontroll %,  $N = 8$ ), de a mérőelektrod közvetlen közelében nőtt (125 $\pm$ 5 kontroll %-ra), ami arra utal, hogy ebben az esetben az egy pontban ponton mért mezőpotenciál jel nem jellemzi jól a teljes CA1 régió idegi aktivitását. Ugyan a VSD jel amplitúdója nem nőtt szignifikánsan a CA1-ben viszont az alakja megváltozott (21. ábra), ami nem mondható el a mezőpotenciál jel alakjáról. Ez a jelenség hasonlóan az NKCC1 gátlásánál látottakhoz a VSD jel integráljának csökkenésében megmutatkozott meg, ami 33 $\pm$ 3 kontroll %-ra csökkent ( $N = 8$ ).

Igaz ugyan, hogy a  $\text{Ba}^{2+}$  a  $\text{K}_{\text{ir}4.1}$  inward rectifier kálium csatorna mellett gátolja a főként a neuronok kifejeződő  $\text{K}_{\text{ir}2.x}$  inward rectifier kálium csatornákat (Inanobe et al., 2002; Day et al., 2005; Andreasen et al., 2007), a  $\text{K}_{\text{ATP}}$  kálium csatornát (Betourne et al., 2009) és a KCNQ1 delayed rectifier kálium csatornát (Gibor et al., 2004) is, mégsem valószínű, hogy a  $\text{Ba}^{2+}$  ezeken a csatornákon keresztül csökkenti a VSD jel amplitúdóját és az integrálját, mert a fent felsorolt csatornák gátlása a neuronok depolarizációját okozza (Andreasen et al., 2007; Petrovic et al., 2012), ami magyarázhatja a mezőpotenciál jel amplitúdójának növekedését, de a VSD jel amplitúdójának hasonló irányba kellene változnia, mint a mezőpotenciál jel amplitúdójának.

Továbbá a mezőpotenciál jel alakja nem változott, míg a VSD jel integrálja csökkent. Mivel az asztrociták csak kis mértékben járulnak hozzá a mezőpotenciál kialakításához (Buzsáki et al., 2012) és mivel az asztrocitákon a legnagyobb mértékben a  $K_{ir4.1}$  inward rectifier kálium csatorna fejeződik ki a fent felsorolt káliumcsatornák közül (Olsen et al., 2006), illetve ez a csatorna felelős az asztrocitákon mérhető  $K^+$  legnagyobb hányadáért (Djukic et al., 2007), ezért a legvalószínűbb, hogy a  $Ba^{2+}$  az asztrocitákon található  $K_{ir4.1}$  inward rectifier kálium csatornán keresztüli  $K^+$  pufferek gátlásával fejt ki hatását a VSD jel integráljára és amplitúdójára.

A CA1-gyel szemben a CA3 és a DG régiókban szignifikánsan csökkent a VSD jel amplitúdója (8. táblázat). Az IOS amplitúdójában bekövetkező változások nem mutattak különbséget a vizsgált régiók között, viszont a VSD jel amplitúdójában mért változások szignifikánsan különböztek a CA3-ban és a DG-ben a CA1-től (egytényezős ANOVA,  $p < 0,05$ ). Ez a jelenség azt mutathatja, hogy az asztrociták részvételének mértéke a VSD jel kialakításában a különböző régiókban eltérő lehet, illetve a különbségek hátterében állhat az egyes régiók különböző aktiválódása is (CA1 orto- versus CA3 és DG antidromikus aktiválódás). Mindkét optikai szignál a mezőpotenciállal azonos irányba változott a CA1 régióban, viszont az IOS és a VSD jelek amplitúdójának hányadosa szignifikánsan különbözött a kontrolltól a CA3 és a DG régiókban ( $1,5 \pm 0,1$  és  $3,0 \pm 0,8$ ). Mivel a  $BaCl_2$  nem hatott az IOS-ra, azt mondhatjuk, hogy ha van egyáltalán a  $K_{ir4.1}$  inward rectifier kálium csatornának szerepe az IOS kialakításában, akkor az csak kismértékű lehet.



**21. ábra: Az asztroglialis  $\text{K}^+$  felvétel blokkolása az IOS-ra csak kis mértékben hat, míg a VSD jelet jelentősen csökkenti a CA3 és a DG régiókban.** **A:** Reprezentatív IOS és VSD amplitúdó térképek, kontroll körülmények között és 500  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$  adagolása alatt. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mezőpotenciál elektród helyét zöld nyíl mutatja. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja. **B:** Reprezentatív mezőpotenciál jel és VSD jel görbék, kontroll körülmények között és 500  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$  adagolása alatt. **C:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója változásának összehasonlítása 500  $\mu\text{M}$   $\text{BaCl}_2$  adagolása alatt. **D:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója változásának összehasonlítása 3  $\mu\text{M}$  ouabain adagolása alatt. Az értékek kontroll %-ban vannak megadva. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól (alatt  $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt, a  $\text{BaCl}_2$   $N = 5$  az IOS és  $N = 8$  a VSD jelek esetében, a ouabain 5 perces adagolása  $N = 7$  az IOS és  $N = 6$  a VSD jelek esetében).

A  $\text{K}_{\text{ir}4.1}$  inward rectifier kálium csatorna mellett a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPáz-nak is nagy szerepe van az asztrociták  $\text{K}^+$  felvételében (Macaulay és Zeuthen, 2012). Ezen felül, Larsen és

munkatársai kimutatták, hogy a Schaffer kollaterálisok ingerlésével kiváltott, megnövekedett extracelluláris  $K^+$  pufferekében a fő szerepet a gliasejteken kifejeződő  $\alpha 2/\beta 2$   $Na^+/K^+$  ATPáz játssza (Larsen et al., 2014).

Mivel a főként neuronokon kifejeződő  $\alpha 1$   $Na^+/K^+$  ATPáz izoforma viszonylag érzéketlen gátlószerére, a ouabainra ( $IC_{50} > 1$  mM) (Price és Lingrel, 1988; Wang et al., 2001; Loreaux et al., 2008), így szelektíven tudtam a főként gliasejteken kifejeződő  $\alpha 2/\beta 2$   $Na^+/K^+$  ATPáz izoforma szerepét vizsgálni, ami 1000-szer érzékenyebb az ouabainra (O'Brien et al., 1994). 3  $\mu$ M ouabain használtam, mert ez már elegendő az  $\alpha 2$  NKA izoformák blokkolásához, viszont a neuronok aktivitását nem gátolja. Mivel az NKA gátlása befolyásolhatja a szövet fiziológiáját, ezért csak azon szeletek jeleit értékeltem ki, amelyeknél a mezőpotenciál jel amplitúdójának legalább 70 %-a regenerálódott a kimosás periódusban.

**9. táblázat.** 3  $\mu$ M ouabain hatása 5 perc és 15 perc adagolást követően az IOS és VSD jelekkel szimultán mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 7$  az IOS és  $N = 6$  a VSD jelek esetében).

	3 $\mu$ M ouabain 5 perc				3 $\mu$ M ouabain 15 perc			
	Mezőpotenciál jel		Optikai jelek		Mezőpotenciál jel		Optikai jelek	
	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS
CA1	146,8 $\pm$ 7,1*	165,9 $\pm$ 13,3*	97,7 $\pm$ 2,5	110,5 $\pm$ 7,8	75,1 $\pm$ 9,0*	209,7 $\pm$ 26,3*	53,6 $\pm$ 13,4*	86,5 $\pm$ 10,5
CA3	-	-	89,6 $\pm$ 4,3*	99,1 $\pm$ 5,2	-	-	30,7 $\pm$ 12,1*	74,8 $\pm$ 10,4
DG	-	-	64,7 $\pm$ 8,5*	90,0 $\pm$ 7,4	-	-	28,6 $\pm$ 9,9*	60,1 $\pm$ 7,8*

A ouabain adagolás első 5 percében a mezőpotenciál jel, az IOS és a VSD jelek amplitúdója hasonlóképpen viselkedett, mint amit a  $BaCl_2$ -nál megfigyeltem (21. ábra). A mezőpotenciál jel amplitúdója nőtt a VSD és az IOS mérések esetében (9. táblázat). Az IOS amplitúdója nem nőtt szignifikánsan a teljes CA1-ben (9. táblázat), viszont szignifikáns növekedést mutatott a mezőpotenciált mérő elektród közvetlen közelében ( $26 \pm 12$  kontroll %-kal,  $N = 7$ ). A CA3-ban és a DG-ben nem változott az IOS amplitúdója (9. táblázat). A VSD és IOS jelek amplitúdói hasonlóan változtak. A VSD a teljes CA1-ben nem változott (9. táblázat), viszont a mérőelektród mellett szignifikáns növekedést ( $116 \pm 5$  kontroll %-ra,  $N = 6$ ) mutatott. Hasonlóan a  $BaCl_2$  adagolásánál látottakhoz, a VSD jel amplitúdója szignifikánsan csökkent a CA3-ban és a CA1-ben (9. táblázat). Ezen felül a VSD jel integrálja is csökkent ( $85 \pm 6$  kontroll %-ra a CA1 régióban,  $N = 6$ ), bár kisebb mértékben, mint a  $BaCl_2$  adagolásnál. Mindkét optikai jel azonos irányban változott a kiváltott válasszal a mérőelektród közelében, de az IOS és VSD jelek hányadosa szignifikánsan különbözött a kontrolltól a DG-ben ( $1,4 \pm 0,1$ ).

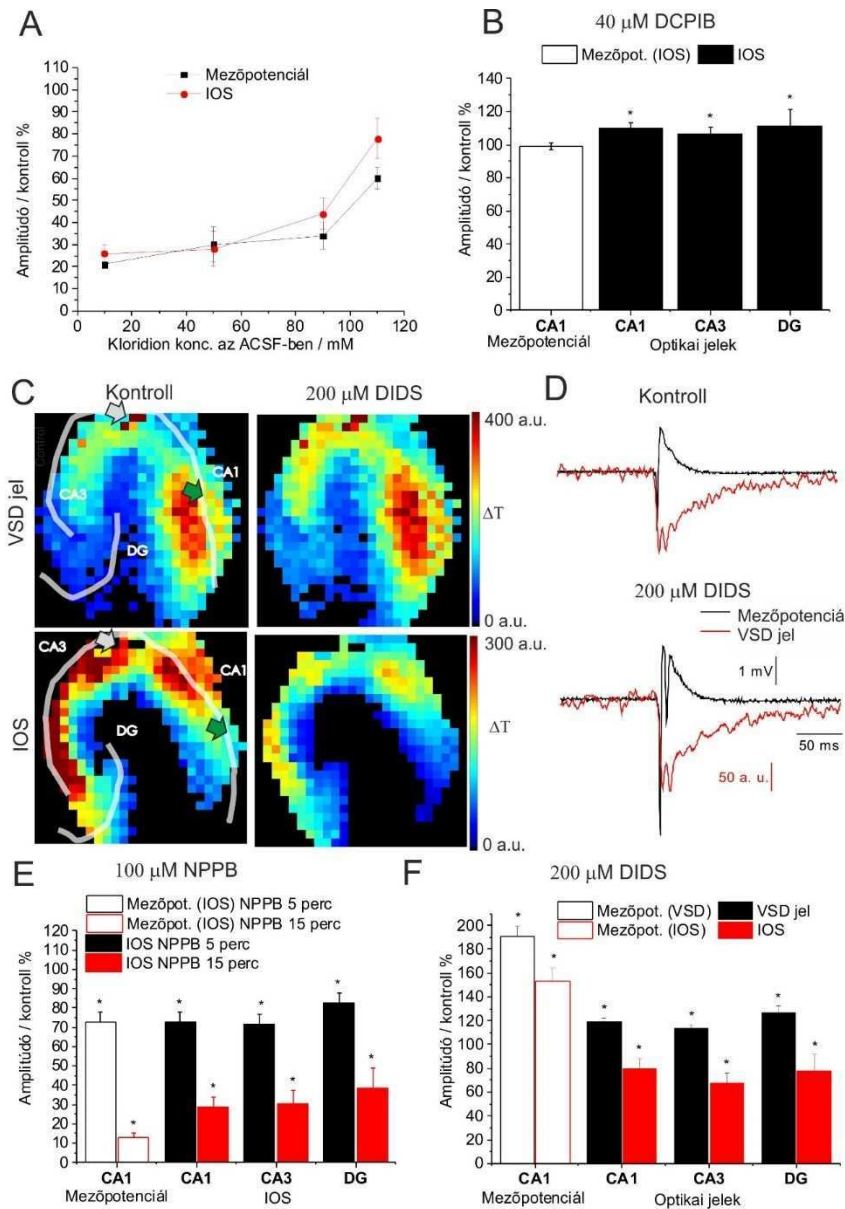
Az IOS amplitúdójában nem voltak szignifikáns különbségek a vizsgált régiók között, viszont a VSD jel amplitúdója a DG-ben szignifikánsan különbözött a CA1-ben és a CA3-ban mért amplitúdóktól.

A ouabain adagolás következő 10 percében a VSD jel mellett mért mezőpotenciál jel amplitúdója csökkent (9. táblázat), de az IOS mérés esetében nagyobb maradt, mint a kontroll (9. táblázat). Ez a viselkedés valószínűleg a két optikai jelnél alkalmazott különböző stimulálási protokollal hozható összefüggésbe. Az IOS kiváltásához használt 10 darab 20 Hz-es stimulálás valószínűleg jobban megnöveli az extracelluláris káliumion koncentrációt, mint a VSD jel kiváltásához használt egyetlen stimulus. Az IOS amplitúdójának csökkenése a CA1 és CA3 régiókban nem volt szignifikáns (9. táblázat), viszont a DG-ben szignifikánsan csökkent (9. táblázat). A VSD jel amplitúdója az összes vizsgált régióban csökkent az előző adagolási ponthoz viszonyítva (9. táblázat).

Figyelembe véve, hogy a  $\text{BaCl}_2$  és a ouabain csak kis mértékben hatott az IOS amplitúdójára, a gliasejtek  $\text{K}^+$  felvétele valószínűleg csak kis mértékben járul hozzá az IOS kialakításához.

#### **4.3.7 Az anion csatornák szerepe az IOS és a VSD jelek kialakításában**

MacVicar és Hochman (MacVicar és Hochman, 1991), valamint Holthoff és Witte (Holthoff és Witte, 1996) korábbi méréseikben kimutatták, hogy ha az ACSF-ben lévő kloridionokat a nem permeábilis glükonát ionra cserélik, az teljesen legátolja az IOS-t. Megismételtem ezeket a kísérleteket és azt tapasztaltam, hogy az IOS amplitúdójának nagysága arányos az ACSF klorid ion koncentrációjával (22. ábra). Ezzel párhuzamosan a mezőpotenciál jel amplitúdója is hasonló összefüggést mutatott (22. ábra).



**22. ábra: A  $[Cl^-]$  és az anion csatornák szerepe az IOS és a VSD jelek kialakításában. A:** Az IOS és mezőpotenciál jel amplitúdója az ACSF-ben lévő  $[Cl^-]$  függvényében. **B:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az IOS (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdó változásának összehasonlítása 40  $\mu$ M DCPIB adagolása alatt. **C:** Reprezentatív IOS és VSD amplitúdó térképek, kontroll körülmények között és 200  $\mu$ M DIDS adagolása alatt. Az áttetsző vonalak a piramis réteget és a gyrus dentatus stratum granulosum rétegét jelzik. Az ingerlő elektród helyét szürke, míg a mezőpotenciál elektród helyét zöld nyíl mutatja. A színskála az alapvonalhoz képest mért transzmittancia változást mutatja. **D:** Reprezentatív mezőpotenciál jel és VSD jel görbék, kontroll körülmények között és 200  $\mu$ M DIDS adagolása alatt. **E:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója változásának összehasonlítása 100  $\mu$ M NPPB adagolása alatt. **F:** A CA1 régióban mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek (CA1, CA3 és DG régiókban) amplitúdója változásának összehasonlítása 200  $\mu$ M DIDS adagolása alatt. Az értékek kontroll %-ban vannak megadva. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól (alatt  $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt, a DCPIB  $N = 7$  az IOS, NPPB  $N = 5$  az IOS, a DIDS adagolása  $N = 5$  az IOS és  $N = 8$  a VSD jelek esetében).



Ezek az eredmények és a furoszemid IOS amplitúdóra gyakorolt gátló hatása szintén azt mutatja, hogy a  $\text{Cl}^-$  gradiensnek igen fontos szerepe van az IOS kialakításában. A  $\text{Cl}^-$  koncentrációjánál látottak felvetik az anion csatornák szerepét, de mivel a mezőpotenciál jel amplitúdója is csökken, ezért nem lehet egyértelműen eldönteni, hogy az IOS csökkenése a mezőpotenciál jel amplitúdó csökkenésének a következménye, vagy közvetlenül az anion csatornák működésének befolyásolásán keresztül hat. Ezért megvizsgáltam különböző anion csatorna gátlók hatását az IOS-ra és a VSD jelekre.

**10. táblázat.** 40  $\mu\text{M}$  DCPIB adagolás hatása az IOS-sal szimultán mért mezőpotenciál jel és az IOS amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 7$ ).

	Mezőpotenciál jel	IOS
CA1	98,9 $\pm$ 2,1	109,6 $\pm$ 3,6*
CA3	-	106,8 $\pm$ 3,5*
DG	-	111,0 $\pm$ 10,5*

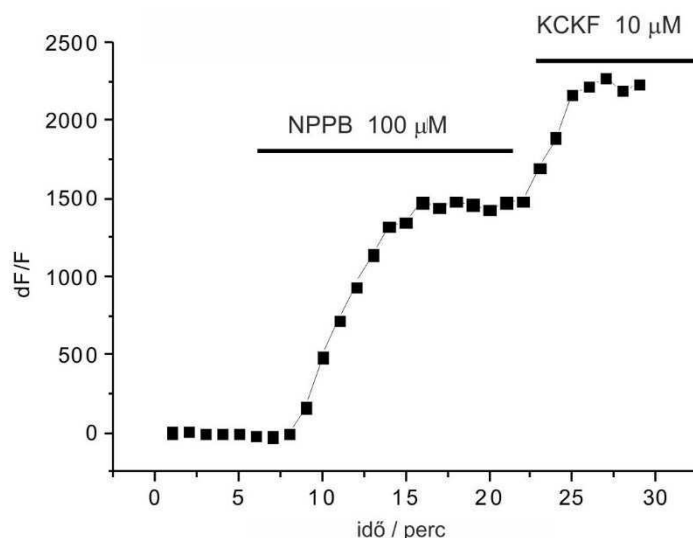
Elsőként a térfogatváltozás-szabályozott anion csatorna (Volume-Regulated Anion Channel, VRAC) gátlószere, a DCPIB hatását vizsgáltam. 40  $\mu\text{M}$  DCPIB nem változtatta meg a mezőpotenciál jel amplitúdóját (10. táblázat), és más paramétereit (PS amplitúdó:  $94 \pm 4$  kontroll %, fEPSP meredekség:  $102 \pm 3$  kontroll %, fEPSP magasság:  $102 \pm 2$  kontroll %,  $N = 7$ ), viszont kis mértékben növelte az IOS amplitúdóját (10. táblázat). Ebből következik, hogy a Schaffer kollaterálisok stimulálása folyamán bekövetkező sejtduzzadás valószínűleg aktiválta a VRAC-ot. Az, hogy a VRAC gátlása növelte az IOS amplitúdóját arra utal, hogy ennek a csatornának az IOS lecsengésében van szerepe. Mivel a DCPIB nem befolyásolta a mezőpotenciál jel paramétereit, ezért ennek a vegyületnek a hatását nem vizsgáltam a VSD jelre.

A DCPIB mellett az NPPB (5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoésav) hatását is megvizsgáltam. Az NPPB egy potens klorid csatorna gátló (Clark et al., 1998), azon belül is azt feltételezik, hogy a VRAC-on fejt ki hatását (Ye et al., 2009).

**11. táblázat.** 100  $\mu\text{M}$  NPPB hatása 5 perc és 15 perc adagolást követően az IOS-sal szimultán mért mezőpotenciál jel és az IOS amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$ ).

	100 $\mu\text{M}$ NPPB 5 perc		100 $\mu\text{M}$ NPPB 15 perc	
	Mezőpotenciál jel	IOS	Mezőpotenciál jel	IOS
CA1	72,4 $\pm$ 5,6*	72,5 $\pm$ 5,3*	12,7 $\pm$ 2,4*	28,7 $\pm$ 4,9*
CA3	-	71,4 $\pm$ 5,0*	-	30,6 $\pm$ 6,4*
DG	-	82,6 $\pm$ 5,4*	-	38,7 $\pm$ 9,9*

100  $\mu$ M NPPB 5 perc adagolás után csökkentette a mezőpotenciál jel amplitúdóját (11. táblázat), míg 15 perc adagolás után a jel csupán  $12,7 \pm 2,4$  kontroll %-a maradt meg, ezzel párhuzamosan csökkentette az IOS amplitúdóját is mindhárom vizsgált régióban (11. táblázat). Ez összhangban van a klorid ion csökkentésénél kapott eredményekkel, ami arra utalhat, hogy klorid csatornák fontos szerepet játszanak mind a mezőpotenciál jel, mind az IOS jel kialakításában, ugyanakkor Lukács Gergely és munkatársai kimutatták, hogy az NPPB szétkapcsolja a mitokondriális ATP szintézist (Lukacs et al., 1991), ami szintén magyarázhatja a mezőpotenciál és IOS jelek csökkenését. Hogy eldönthessem, hogy az NPPB a klorid csatornákon vagy a mitokondriumban lévő anyagcsere befolyásolásán keresztül hat, előkísérleteket végeztem, hogy az általam vizsgált rendszerben is szétkapcsolja-e az ATP szintézist. Ezt a mitokondrium membránpotenciáljának monitorozásával követtem nyomon, és összehasonlítottam az NPPB hatását a mitokondrium szétkapcsoló ágens (Kovács et al., 2005) KCKF (karbonil cianid 3-klorofenilhidrazon) hatásával. A mitokondrium membránpotenciálját a rhodamine-123 (R123) festék segítségével monitoroztam. Az 23. ábra mutatja, hogy az NPPB depolarizálta a mitokondriumot, ami arra utal, hogy hatását valószínűleg a mitokondriális anyagcsere megzavarásán keresztül fejt ki és nem a klorid csatornákon való gátló hatásán keresztül, ami magyarázza a mezőpotenciál jel amplitúdójának nagymértékű csökkenését is. Ez felveti a mitokondriális anyagcsere szerepét az IOS kialakításában, valamint hogy korábbi munkákban az NPPB mitokondriumon való hatását vagy a klorid ioncsatorna gátló hatását detektálták-e.



**23. ábra: Mitokondrium depolarizáció NPPB (100  $\mu$ M) hatására.** A grafikon a rhodamine-123 (R123) festék fluoreszcencia változását mutatja az idő függvényében hippokampusz szeletben, NPPB és KCKF adagolás hatására. Az R123 festéket használják a mitokondrium membránpotenciáljának nyomon követésére. Kontroll körülmények között az R123 festék behatol a mitokondriumba és az önkiliótás miatt a fluoreszcencia intenzitás alacsony. Ha a mitokondrium depolarizálódik a festék kikerül a mitokondriumból és a fluoreszcencia intenzitás megnő. A gerjesztő lézer hullámhossza 488 nm, míg a detektálás 510-530 nm-en végeztük. A két kép közötti időintervallum 1 perc volt. A görbe felett látható vízszintes vonalak jelzik a vonal fölé írt vegyület adagolásának időtartamát. A vegyületek rövidítései: feloldása és célfehérjék: karbonil cianid 3-klorofenilhidrazon (KCKF) ami egy mitokondrium szétkapcsoló ágens, 5-Nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoésav (NPPB) kereskedelembe kapható potens anion csatorna inhibitor.

**12. táblázat.** 200  $\mu$ M DIDS hatása az IOS és VSD jelekkel szimultán mért mezőpotenciál jel és az optikai jelek amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$  az IOS és  $N = 8$  a VSD jelek esetében).

	Mezőpotenciál jel		Optikai jelek	
	VSD jel	IOS	VSD jel	IOS
CA1	191,2 $\pm$ 8,5*	153,2 $\pm$ 11,1*	119,5 $\pm$ 2,9*	79,6 $\pm$ 8,8*
CA3			113,6 $\pm$ 3,2*	67,2 $\pm$ 9,0*
DG			126,9 $\pm$ 5,1*	77,5 $\pm$ 14,6*

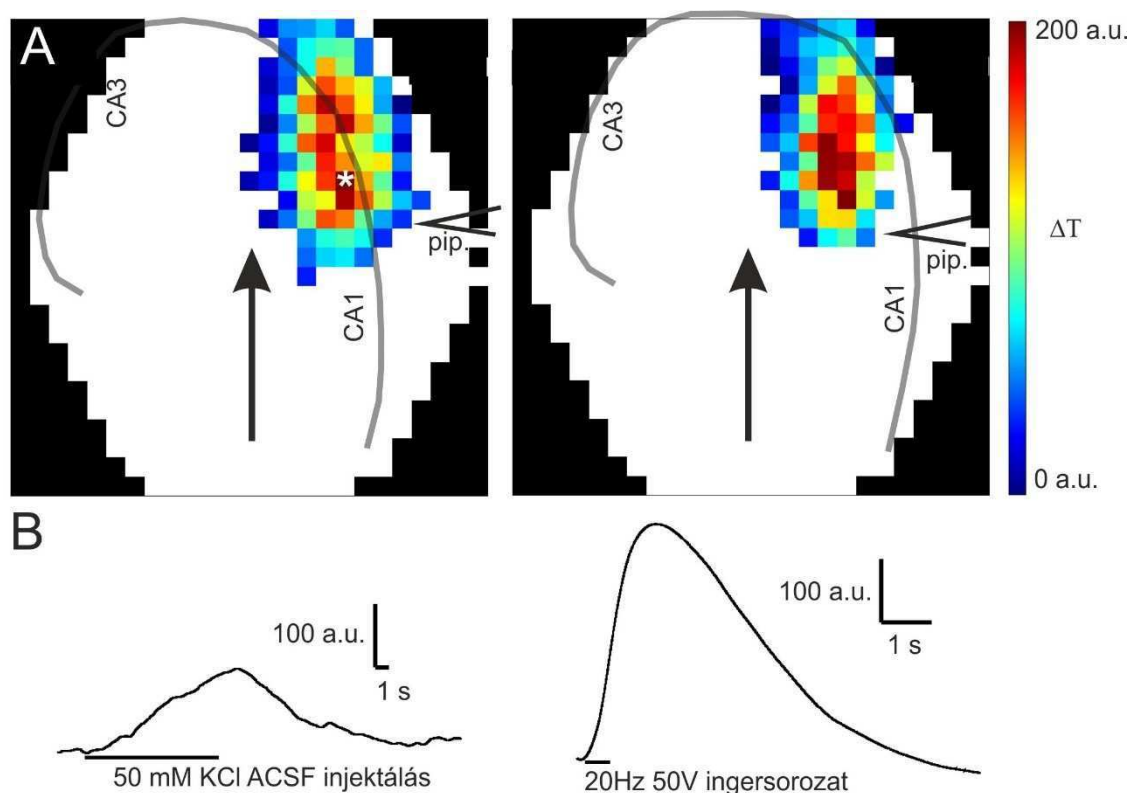
A DCPIB-bel ellentétben az általános, nem specifikus anion csatorna inhibitor, DIDS (200  $\mu$ M) növelte a mezőpotenciál jel (12. táblázat) és a PS amplitúdóját ( $220 \pm 13$  kontroll %-ra,  $N = 8$  és  $267 \pm 40$  kontroll %-ra,  $N = 5$  a VSD jel és az IOS esetében), viszont az fEPSP meredekségét ( $63 \pm 4$  %-ra,  $N = 8$  és  $73 \pm 6$  kontroll %-ra,  $N = 5$  a VSD jel és az IOS esetében) csökkentette. A VSD jel amplitúdója minden vizsgált régióban egyenletesen nőtt (12. táblázat,

22. ábra), ezzel szemben az IOS amplitúdója egyenletesen csökkent az összes régióban (12. táblázat, 22. ábra). Hasonlóan a furoszemidnél látottakhoz, az IOS és a VSD jelek amplitúdójának hányadosa szignifikánsan különbözött a kontrolltól az összes régióban ( $0,7 \pm 0,1$ ,  $0,6 \pm 0,1$  és  $0,6 \pm 0,1$  a CA1, a CA3 és a DG esetében). Mind az IOS, mind a VSD jelek amplitúdója különböző mértékben vagy különböző irányban változott meg, mint a mezőpotenciál jel amplitúdója, amit az IOS/mezőpotenciál jel és a VSD jel/mezőpotenciál jel amplitúdó hányadosok kontrolltól való eltérése is jól mutat ( $0,6 \pm 0,1$  és  $0,5 \pm 0,1$ ).

Mivel a DIDS mindkét optikai jelet szétkapcsolja a mezőpotenciál jeltől, a DIDS célfehérjéje valószínűleg szerepet játszik mindkét optikai jel kialakításában. Az a jelenség, hogy a DIDS hatása a különböző régiókban nem különbözik szignifikánsan egyik optikai szignál esetében sem, arra utal, hogy a DIDS célmolekulája valószínűleg egyenletes eloszlásban van jelen a vizsgált régiókban. A DIDS a furoszemidhez hasonlóan megbontja a mezőpotenciál jel és az IOS amplitúdója közötti lineáris összefüggést, illetve a VSD is azonos irányban változik a mezőpotenciál jel amplitúdójával. Ez arra utal, hogy a DIDS a furoszemidhez hasonlóan megbontja a neuronális aktivitás és az IOS közötti kapcsolatot. A DIDS hatása az IOS amplitúdójára azt is mutathatja, hogy a DIDS célmolekulája elősegíti a stimulálás hatására bekövetkező sejtduzzadást.

Annak érdekében, hogy megmagyarázzam a DIDS mezőpotenciál jel paramétereire gyakorolt hatását, cell-attached és whole-cell patch clamp technikákkal vizsgáltam a neuronok aktivitását különböző intracelluláris  $\text{Cl}^-$  koncentrációk mellett. A cell-attached technika esetében a vizsgált sejtben az intracelluláris klorid koncentráció fiziológiás marad, míg a whole cell current clamp technikánál a sejtben lévő kloridion koncentrációt a patch pipetában lévő kloridion mennyisége határozza meg. Meg kell jegyezni, hogy ezeket a kísérleteket metodikai okokból fiatalabb (P11-P20) állatokon végeztem, viszont a DIDS hatása a mezőpotenciál jel amplitúdóján nem különbözött az idősebb állatokhoz képest és ez arra utal, hogy azok a folyamatok, amik a DIDS hatásáért felelősek, ezekben az állatokban már ki vannak fejlődve. Mind a cell-attached, mind a whole cell current clamp mérések esetében megnőtt a neuronok tüzelése a DIDS adagolás alatt. A cell-attached mérés esetében a stimulálással kiváltott akciós áramok száma ( $228 \pm 29$  kontroll %-ra,  $N = 7$ ), míg a whole cell current clamp mérések esetében a stimulálással kiváltott akciós potenciálok száma nőtt ( $260 \pm 67$  kontroll %-ra,  $N = 7$ ). Mivel a cell-attached és a whole cell current clamp mérések eredményei szerint a neuronok tüzelése hasonlóan változik, ez azt mutatja, hogy a DIDS megnöveli a neuronok tüzelésének mértékét, függetlenül az intracelluláris kloridion koncentráció változásától. Mivel a DIDS az anion csatornákon túl hat a mitokondriális belső membrán anion csatornára (Beavis és Davatol-Hag,

1996), a  $K_{v4.2}$  és  $K_{v4.3}$  kálium csatornákra (Wang et al., 1997), a nátrium függő  $Cl^-/CHO_3^-$  antiporterre (Lai et al., 1996), elképzelhető, hogy ezeken a fehérjéken való hatása miatt növeli meg a neuronok tüzelésének mértékét.



**24. ábra: Az emelt  $[K^+]$  ACSF injektálásával kiváltott IOS és az afferens ingerlés kiváltotta IOS tér és időbeli lefutása jelentősen különbözik. A:** IOS amplitúdó térképek, miután emelt  $[K^+]$  ACSF-t ( $[K^+] = 50\text{mM}$ ) injektáltam a szelet felszínére a stratum oriens (balra) és stratum radiatum (jobbra) rétegekben egy patch pipetta segítségével. A pipetta helyzetét “<” szimbólum jelzi. Az áttetsző vonalak a piramis réteget, míg a nyíl az ACSF áramlásának irányát mutatja. **B:** Reprezentatív afferens stimulálással kiváltott (jobbra) és emelt  $[K^+]$  ACSF injektálásával (balra) kiváltott IOS görbék összehasonlítása.

A DCPIB hatása azt mutatta, hogy az afferens stimulálás kiváltotta IOS generálásában szerepet játszik a sejtduzzadás. Felmerül a kérdés, vajon a sejtduzzadással asszociált IOS, amit más stimulálással váltanak ki, hasonló térbeli mintázatot és időbeli lefutást mutat-e. Hogy megvizsgáljam, hogy az IOS tér- és időbeli lefutása mennyire függ az ingerlés módjától, összehasonlítottam megnövelt káliumion koncentrációval kiváltott és az afferens ingerléssel kiváltott IOS térbeli eloszlását és időbeli lefutását. A megnövelt kálium koncentráció alkalmazása sejtduzzadást vált ki (Pasantes-Morales és Schousboe, 1989; Schousboe és Pasantes-Morales, 1992; Hansson et al., 2000), ezért ebben a kísérletben arra is kerestem a választ, vajon a sejtduzzadás okozta IOS milyen hasonlóságot mutat a neuronális aktivitás fokozásával kiváltott IOS-hoz.

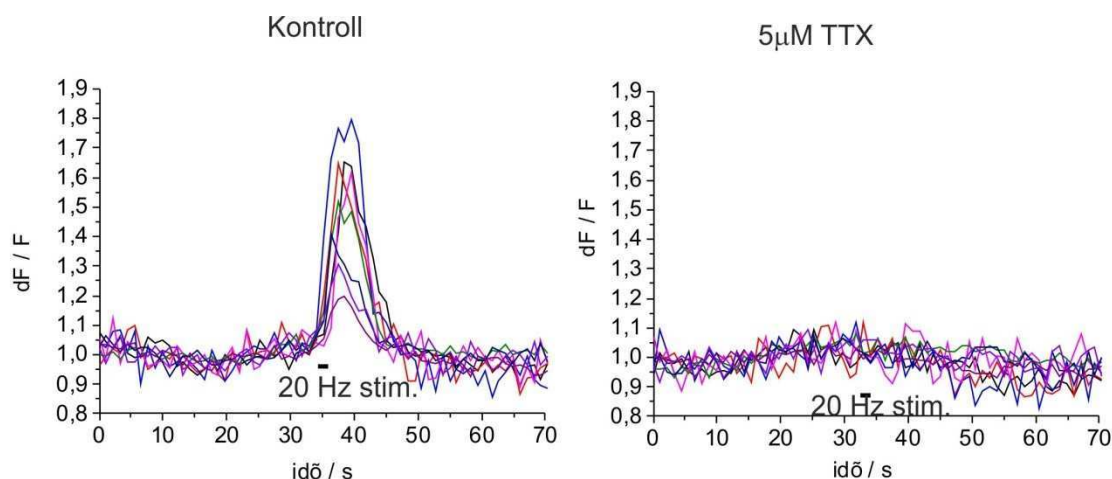
A megnövelt  $K^+$  koncentrációjú ACSF-t ( $[K^+] = 50 \text{ mM}$ ) lokálisan adagoltam egy patch pipetta segítségével. A normál ACSF ugyanilyen módú adagolása a szelet ugyanazon pontján nem váltott ki IOS-t, így megbizonyosodtam róla, hogy a pipettából kiáramló puffer nyomása önmagában nem vált ki IOS-t. Mivel a megnövelt  $[K^+]$  a sejtduzzadáson kívül az idegsejteket is depolarizálhatja (Somjen, 1979), ezért az  $50 \text{ mM } K^+$  ACSF puffot a CA1 stratum oriens és stratum radiatum rétegeiben egyaránt alkalmaztam, hogy lássam van-e a különbség az IOS térbeli eloszlásában a különböző típusú (orto- versus antidromikus) idegi depolarizáció eseteinél. IOS minden esetben csak a pipetta közvetlen közelében volt mérhető (24. ábra), jelezve, hogy az IOS ebben a kísérleti elrendezésben csak a sejtek lokális válaszát mutatja a megnövekedett  $K^+$  koncentrációra. Az IOS amplitúdójának térbeli eloszlása az alkalmazás helyétől függetlenül azonos mintázatot mutatott, ami arra utal, hogy az IOS a káliummal kiváltott sejtduzzadást méri és nem az idegsejtek depolarizációja nyomán keletkezik, mivel ellenkező esetben a stratum oriensben történt  $50 \text{ mM } K^+$  ACSF puff esetében a neuronális depolarizáció indukálta IOS jóval nagyobb amplitúdójú lenne a piramis rétegben, mint a stratum radiatumban.

Az afferens ingerlés és az emelt  $[K^+]$  által kiváltott IOS időbeli lefutása szintén szignifikáns különbséget mutatott (24. ábra). Mindkét jel pozitív amplitúdójú volt, a stimulálást követően meredeken futottak fel, maximumukat a stimulálás befejeződése után érik el, de az emelt káliummal kiváltott IOS az afferens ingerlés kiváltotta optikai jelnél sokkal gyorsabban cseng le.

Az emelt káliummal kiváltott és a Schaffer kollaterális ingerlés kiváltott IOS térbeli eloszlásában és időbeli lefutásában látott különbségek arra utalnak, hogy a két jel kialakításának háttérében különböző mechanizmusok állhatnak.

#### **4.3.8 Az asztrociták aktivációjának szerepe az IOS kialakításában**

Mivel a korábbi munkák feltételezik, hogy az IOS kialakításának háttérében legnagyobb részt az asztrociták állnak, ezért megvizsgáltam az asztrociták aktiválódását Schaffer kollaterális ingerlés hatására, kalcium szignálok nyomon követésével. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan (Porter és McCarthy, 1996), az asztrociták aktiválódtak az elektromos ingerlés hatására (25. ábra). Ez az ingerléshez kötött asztrocita aktiváció az IOS-hoz hasonlóan teljesen eltűnt TTX hatására.



**25. ábra: Asztrocita kalcium szignál kontroll és 5  $\mu$ M TTX adagolás alatt.** A grafikonok a Fluo-4 festék fluoreszcencia intenzitásának változását mutatják az idő függvényében, Schaffer kollaterális stimulálás hatására, hippokampusz szelet CA1 régióban, kontroll körülmények között (balra) és 5  $\mu$ M tetrodotoxin (TTX) adagolása (jobbra). A Schaffer kollaterálisok stimulálásához 3 20 Hz-es 10 darab stimulusból álló ingersorozatot használtam, melyben egy stimulus szélessége 0,2 ms, nagysága pedig 40V volt. Az ingerlés időtartamát a grafikonokon a görbék alatt látható vízszintes vonal jelöli. A képalkotáshoz használt gerjesztő lézer hullámhossza 488 nm, míg a detektálás 510-530 nm-en végeztem. A két kép közötti időintervallum 1,1 másodperc volt.

Korábbi munkánkban kimutattuk nucleus accumbens akut patkány agyszeleteken, hogy az asztrociták aktiválódnak ATP, illetve az endogén metabolit borostyánkősav adagolásának hatására (Molnár et al., 2011b). Az IOS amplitúdójának  $24 \pm 1$  kontroll %-a nem gátolható APV, CNQX és DHK jelenlétében, ezt a fennmaradó részt okozhatja az neuronokból felszabaduló ATP hatása az asztrocitákon (Fields, 2011a). Mivel az ATP aktiválja az asztrocitákat a P2Y<sub>1</sub> receptoron keresztül (Molnár et al., 2011a), ezért megvizsgáltam a specifikus P2Y<sub>1</sub> receptor antagonistá, MRS2179 (100  $\mu$ M) hatását az IOS és a mezőpotenciál jel paramétereire.

**13. táblázat.** 100  $\mu$ M MRS2179 adagolás hatása az IOS-sal szimultán mért mezőpotenciál jel és az IOS amplitúdójára, kontroll százalékban kifejezve a vizsgált régiókban. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt,  $N = 5$ ).

	Mezőpotenciál jel	IOS
CA1	77,1 $\pm$ 4,2*	76,3 $\pm$ 7,6*
CA3	-	88,3 $\pm$ 8,0*
DG	-	91,1 $\pm$ 20,0*

Az MRS2179 csökkentette a mezőpotenciál jel paramétereit ( $77 \pm 4$  kontroll %-ra a mezőpotenciál jel amplitúdója,  $82 \pm 3$  kontroll %-ra a mezőpotenciál jel magassága,  $55 \pm 6$  kontroll %-ra a PS és  $89 \pm 5$  kontroll %-ra az fEPSP meredeksége esetében,  $N=5$ ). A mezőpotenciál jel paramétereirehasonlóan az IOS amplitúdója is szignifikánsan csökkent az összes vizsgált régióban (13. táblázat). Az MRS2179 hatása a mezőpotenciál jelre magyarázható azzal, hogy a  $P2Y_1$  receptor jelen van a CA1 piramissejteken is és aktiválódása gátló hatást fejt ki rájuk (Morán-Jiménez és Matute, 2000). Mivel az IOS amplitúdójának csökkenése és a mezőpotenciál jel amplitúdójának csökkenése igen hasonló mértékű, az IOS amplitúdója valószínűleg passzívan követi a mezőpotenciál jel amplitúdójának változását. Ezek alapján az asztrociták aktivációja a  $P2Y_1$  receptoron keresztül csak elhanyagolható mértékben járulhat hozzá az IOS kialakításához.

## 5 DISZKUSSZIÓ

Mind a VSD, mind a IOS képalkotó módszereket széles körben alkalmazzák *in vitro* (Willadt et al., 2013; Borbély et al., 2014) és *in vivo* (Ikrar et al., 2013; Bauer et al., 2014) a neuronális aktivitás térképezésére. Annak ellenére, hogy ezek a szignálok korrelálnak az idegi aktivitással és információt adnak a terjedési mintázatról, a különböző sejtípusok hozzájárulása az IOS és VSD szignálokhoz, illetve a szignálok háttérében meghúzódó részletes molekuláris mechanizmus a mai napig nem teljesen ismert. Hogy jobban megérthessem az optikai szignálok háttérében álló molekuláris mechanizmusokat, patkány hippocampusz szeletben Schaffer kollaterális ingerléssel kiváltott IOS és VSD jeleket hasonlítottam össze egymással, valamint szimultán, a CA1 régióban mért elektrofiziológiai mezőpotenciállal az optikai szignálok kialakításában potenciálisan részt vevő fehérjék, molekuláris mechanizmusok farmakológiai gátlása mellett. Mivel az alkalmazható mezőpotenciál elektródok mennyisége korlátozott, a feszültségfüggő festék képalkotással igyekeztem a mezőpotenciál mérés térbeli limitáltságát kiküszöbölni, mintegy köztes réteggént az IOS és a mezőpotenciál között.

Fő eredményeim a következő pontokban foglalhatók össze:

- i) annak ellenére, hogy az IOS és a VSD jelek időskálája különböző, mindkét jel lineárisan korrelált a mezőpotenciál jel amplitúdójával. A feszültségfüggő  $Na^+$  ioncsatornák gátlása tetrodotoxinnal megszüntette, míg a GABAerg diszinhibíció picrotoxinnal növelte mindkét jel amplitúdóját, ami arra utal, hogy mindkét optikai jel függ a neuronális aktivitás mértékétől.



- ii) Az optikai szignálok nagy része gátolható ionotróp glutaminsav receptor inhibitorokkal, ezért mindkét optikai szignál legnagyobb hányada (~70 %-át) glutamáterg aktivitásfüggő.
- iii) Annak ellenére, hogy az IOS és a VSD jelek időskálája különböző, mindkét optikai jel jól leírja az aktiválódott terület nagyságát és a görbék időbeli lefutásában lévő különbségek alapján mindkét jel alkalmas a különbözőképpen (orto- és antidromikusan) aktiválódott területek megkülönböztetésére.
- iv) Az asztrociták glutaminsav felvétele az EAAT2 asztrogliális transzporterén keresztül fontos komponense mind az IOS, mind a VSD jelnek – a VSD jel esetén a kontribúció a gyors időskálán (< 5 ms) is megfigyelhető.
- v) Az asztrociták glutaminsav felvételének hozzájárulása a VSD jelhez régióspecifikusan változik a CA1-en és a CA3-on belül.
- vi) A korábban feltételezett asztrogliális  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  kotranszporter nem, viszont a neuronokon kifejeződő  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  kotranszporter hozzájárul az IOS kialakításához.
- vii) A gliális  $\text{K}^+$  felvétel a  $\text{K}_{\text{ir4.1}}$  káliumcsatornán és a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázon keresztül a korábbi feltételezésekkel ellentétben csak kis mértékben járul hozzá az IOS kialakításához, viszont a VSD jelhez szignifikánsan hozzájárul hasonló régióspecifitással, mint az EAAT2 transzporter.
- viii) Az anion csatornák gátlása elkülöníti a mezőpotenciál jelet és a VSD jelet az IOS-tól, ami ezen csatornák és a kloridion gradiens fontosságára hívja fel a figyelmet az IOS kialakításában.
- ix) Ingerléssel kiváltott, in vitro IOS térbeli eloszlása és mechanizmusa függ az alkalmazott stimulus típusától.
- x)  $\text{Ca}^{2+}$  szignál méréseim megerősítik, hogy az asztrociták aktiválódnak a Schaffer kollaterálisok ingerlésére, de mivel a  $\text{P2Y}_1$  receptor antagonista nem választotta szét az IOS és a mezőpotenciál jel változásának mértékét, valószínűleg a  $\text{P2Y}_1$  receptor nem vesz részt az IOS kialakításában.

Az in vivo mért IOS-hoz kismértékű a hozzájárulása (Frostig et al., 1990; Narayan et al., 1994a, 1994b), viszont az in vitro mért IOS szinte kizárólagos forrása a fényszórásban illetve a fényelnyelésben történő változás (MacVicar és Hochman, 1991; Federico et al., 1994; Holthoff és Witte, 1996, 1998). A korábbi irodalmi munkák azt állítják, hogy az in vitro afferens stimulálással kiváltott IOS-ban a fényszórás változást a sejtduzzadás okozza (MacVicar és Hochman, 1991; Holthoff és Witte, 1996, 1998), mert nem érzékeny a megvilágító fény hullámhosszára, azon belül a hosszabb hullámhosszokon (>670 nm), amik mélyebben hatolnak

a szövetbe nagyobb az amplitúdója (Aitken et al., 1999). Mivel az általam 700 nm-en detektált IOS-hoz kevésbé járul hozzá a szövetben maradó hemoglobin, melyet jellemzően 600-660 nm-en mérnek (Ba et al., 2002; Devor et al., 2003; Wankhede et al., 2010) és a szövetben maradó citokrómok, mint például a porfirinek, melyek maximális abszorbanciája 440 nm-en detektálható (Mané és Müller, 2012), továbbá a dendritek károsodásából eredő, illetve a mitokondrium szerkezetének megváltozásából adódó fényszórás változások az erőteljes aktivációhoz kapcsolhatók (utazó hullám, excitotoxicitás (Jarvis et al., 1999; Müller és Somjen, 1999; Fayuk et al., 2002)), ezért az általam detektált IOS forrása nagy valószínűség szerint a sejtduzzadás. Állításomat tovább támogatja az a tény, hogy az afferens stimulálással kiváltott IOS érzékeny a sejtduzzadást befolyásoló beavatkozásokra, mint a furoszemid alkalmazására és az extracelluláris klorid koncentráció csökkentésére (MacVicar és Hochman, 1991; Holthoff és Witte, 1996, 1998).

Az általam használt feszültségfüggő festék az NK3630 (más néven RH482), gyors típusú, oxonol, abszorbancia festék, ami a membránpotenciál változásra abszorbancia változással reagál. Az NK3630 feszültségfüggő festék megfesti a neuronokat és a gliasejteket egyaránt (Konnerth et al., 1987; Kojima et al., 1999). Több publikáció is megjelent arról, hogy a festék által detektált jel lassú komponensében számottevő a gliális membránpotenciál-változások hozzájárulása (Konnerth et al., 1987; Kojima et al., 1999; Chen és Sokabe, 2005; Hill és Greenfield, 2013). A mezőpotenciálban is ismert a gliasejtek szerepe, de csak a lassú 1 Hz-es vagy annál lassabb jelekben (Buzsáki et al., 2012).

Összefoglalva, az irodalmi adatok szerint, az IOS a neuronális aktiváció hatására bekövetkező, elsősorban gliális eredetűnek vélt sejtduzzadást, míg a VSD jel gyors időskálán a neuronok, lassabb időskálán a neuronok és gliasejtek membránpotenciáljának változásait mutatja.

Mindezek ellenére, nem tisztázott az optikai jelek pontos molekuláris mechanizmusa, a különböző sejtípusok hozzájárulásának aránya, illetve az sem teljesen világos, hogy milyen az egyes sejtek időbeli hozzájárulása.

## **5.1 Az IOS és a VSD jel legnagyobb része a posztzinaptikus glutamáterg aktivitás következménye**

Mivel az IOS és a VSD jelek amplitúdója lineárisan korrelált a piramis rétegben mért kiváltott mezőpotenciál válasz paramétereivel, illetve az optikai jelek térbeli kiterjedése alapján arra következtetnek, hogy mindkét optikai jel a szövet excitabilitásának mértékét tükrözi. Ezt tovább erősíti, hogy mindkét jel teljesen leblokkolható TTX-szel és mindkét optikai jel nő, ha

a neuronális aktivitás mértékét fokozzuk a gátlás gátlásával, a GABA<sub>A</sub> receptor antagonistá picrotoxinnal. Megmutattam, hogy az IOS a mezőpotenciál változásától függetlenül gátolható a DHK, furoszemid és DIDS alkalmazásával, ami alátámasztja a glutaminsav felvétel, a K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> transzport és az anion csatornák közvetlen szerepét az IOS kialakításában. Ezzel szemben a VSD jel a DHK kivételével, minden alkalmazott vegyületnél a kiváltott válasszal azonos irányba változott a mezőpotenciál elektród közvetlen közelében lévő diódán, mutatva, hogy a VSD jelben a gliális glutaminsav felvételnek van fontos közvetlen szerepe. Az, hogy az IOS változása DHK, furoszemid és picrotoxin adagolása alatt követi az fEPSP meredekségének változását, egyezően a korábbi megállapításokkal (Das és Gilbert, 1995; Cerne és Haglund, 2002), arra utal, hogy az IOS a serkentő glutamáterg szinaptikus áramokat mutatja. Az általam használt modellben az IOS több mint 75 %-a gátolható volt az ionotróp glutaminsav receptorok (AMPA/kainát és NMDA) gátlásával. A korábbi munkák többsége arra a következtetésre jutott, hogy az IOS a posztzinaptikus aktivitás következménye (Dodt et al., 1996; Cerne és Haglund, 2002; Holtkamp et al., 2011), mert blokkolható kinureinsavval vagy Ca<sup>2+</sup>-mentes ACSF-fel (MacVicar és Hochman, 1991; Andrew és MacVicar, 1994; Dodt és Zieglgänsberger, 1998; Cerne és Haglund, 2002).

Ezzel párhuzamosan a VSD jel több, mint 65 %-a volt blokkolható az AMPA/kainát és az NMDA receptorok gátlásával. Az IOS-sal ellentétben a VSD jelről leírták, hogy jelentős nagyságú preszinaptikus komponenst tartalmaz (Grinvald et al., 1982; Kojima et al., 1999; Chen és Sokabe, 2005). Preszinaptikus komponens alatt a presynaptic fiber volleyt értem, ami a preszinaptikus axonokon terjedő ingerületet méri (Andersen et al., 2007). A fent megnevezett munkákban viszont az ingerlő elektród helye igen közel volt ahhoz a régióhoz, ahonnan az optikai jeleket mérték. Megfigyeléseim szerint az ingerlő elektródhoz közeli régióban jóval nagyobb a presynaptic fiber volley amplitúdója, mint attól távolabb. Az általam mért szeleteken szintén az ingerlő elektród közelében (<500 µm) voltak megtalálhatóak azok a jelek, amik nem voltak gátolhatók AMPA/kainát és NMDA receptor antagonistákkal, ami arra utalhat, hogy ezekben a megmaradó VSD jelekben is van preszinaptikus komponens. Illetve ez azt is jelezheti, hogy a VSD jel pre- és posztzinaptikus komponenseinek aránya függhet az ingerlő elektródtól való távolságtól. Az eredményeim alapján feltételezem, hogy az ionotróp glutaminsav receptor gátlók a posztzinaptikus aktivitás csökkentésével fejtik ki hatásukat az optikai jeleken.

Érdemes megjegyezni, hogy szignifikáns különbség van az IOS és a VSD jel amplitúdójának arányában az összes általam vizsgált régióban, ami arra utal, hogy az ionotróp glutamáterg receptorok hozzájárulása az IOS és a VSD jelekhez különböző. Ez szintén azt

erősíti, hogy az általam detektált VSD jelben is jelen van a preszinaptikus komponens, ami nem gátolható az ionotróp glutaminsav receptorok blokkolásával, vagy jelezheti az asztrociták, illetve az interneuronok depolarizációjának hozzájárulását a VSD jelhez. Ezen felül, az, hogy az APMA/kainát receptorok gátlását követően az NMDA receptorok gátlása jobban gátolta az IOS jelet a mezőpotenciál jelenléténél, abba az irányba mutat, hogy a  $Mg^{2+}$ -független asztroglialis NMDA receptorok (Verkhratsky és Steinhäuser, 2000; Deitmer és Rose, 2010) aktivációjának szerepe lehet az IOS kialakításában.

## **5.2 Az IOS nem követi a VSD jel által indikált membránpotenciál-változási mintázatot**

A korábbi tanulmányok, amik afferens ingerléssel kiváltott IOS-t írtak le hippocampusz szeletben, nem közöltek információt a jel terjedéséről, illetve az IOS-t kialakító folyamatok temporális karakterizálásáról, valószínűleg az ezekben a kísérletekben használt képalkotó eszközök alacsony időbeli felbontása miatt (MacVicar és Hochman, 1991; Andrew és MacVicar, 1994; Dodt et al., 1996; Aitken et al., 1999; Macvicar et al., 2002). A PDA lehetővé teszi, hogy az optikai jeleket az elektrofiziológiai jelhez hasonló időbeli felbontással detektáljuk. Ezzel a nagy sebességű képalkotó eszközzel megmutattam, hogy a neuronális aktiváció megelőzi az IOS-t a CA3-ban és a CA1-ben. Meglepő módon az IOS a CA3 és a CA1 régiókban elsőként a piramis rétegben jelenik meg, majd onnan terjed a stratum radiatumba. Mivel a neuron és gliasejtek relatív aránya a piramistrétegben magasabb, a jel ilyen típusú időbeli megjelenése ellentmondásban van azzal, hogy az IOS-t elsősorban a gliasejtek generálják. Ez a fajta időbeli lefutás inkább arra utal, hogy az IOS-ban részt vevő asztroglialis folyamatok a neuronális aktiváció következményei. Ezt a nézőpontot az is támogatja, hogy az IOS picrotoxin jelenlétében legnagyobb mértékben a piramis rétegben nő, míg a CNQX hatására a stratum radiatumban csökken a legnagyobb mértékben.

Az IOS terjedésével ellentétben a VSD jel terjedése teljesen más mintázatot mutat. A VSD jel az ingerlő elektród közvetlen közeléből indul, és onnan terjed végig a piramis réteg mentén (az összes sejtrétegben), párhuzamosan a CA3 és a CA1 régiókban. A két optikai jel terjedésében való különbségek mutatják, hogy az IOS nem követi a VSD jel által indikált membránpotenciál változási mintázatot.

Az ideig aktivitás kiváltotta IOS teljesen más időbeli és terjedési mintázatot mutatott a CA1 és a CA3 régiókban, ami valószínűleg azzal magyarázható, hogy a két régió különböző típusú ingerlést kapott (a CA1 ortodromikusan, míg a CA3 antidromikusan lett stimulálva). Ez jellemző volt a VSD jelre is. Az ortodromikusan és az antidromikusan kiváltott optikai jeleket

a sejtrétegekben mutatott eltérő eloszlásuk és időbeli lefutásukban lévő különbségek alapján tehát el lehet különíteni.

Érdekes, hogy megfigyeltem az IOS terjedését a CA1 radiátumban a szelet mindkét vége felé a piramis réteg mentén. Az IOS terjedési sebessége három nagyságrenddel lassabb volt a VSD jel és a mezőpotenciál jel terjedésénél, viszont két nagyságrenddel gyorsabb volt, mint az asztrociták esetében diffuzibilis mediátorral terjedő kalcium hullám. Ez felveti a réskapcsolatok szerepét az IOS terjedésének mechanizmusában.

### **5.3 Az EAAT2 transzporter részt vesz az IOS és a VSD jel kialakításában**

Az asztrocitáknak kulcsszerepe van a glutamáterg neurotranszmisszióban, mivel a neuronok által kibocsájtott glutaminsav nagy részét az asztrociták veszik fel (Coulter és Eid, 2012; Wang et al., 2012), ezért az asztrociták glutaminsav felvétele potenciálisan hozzájárulhat az IOS-hoz. Ahhoz, hogy a kérdést tisztázzam, a preszinaptikus neuronok aktivációja során felszabaduló glutaminsav felvételét gátoltam egy EAAT2-szelektív (Arriza et al., 1994) vegyülettel, a DHK-val. Várakozásaimnak megfelelően, a megnövekedett extracelluláris glutaminsav koncentráció (Massieu et al., 1995; Nyitrai et al., 2006) megnövelte a populációs tüske amplitúdóját, amit a neuronok megnövekedett tüzelési rátája okoz (White et al., 1994). Ezzel egy időben az IOS amplitúdója csökkent, ami arra utal, hogy az in vitro IOS kialakításában közvetlenül részt vesz az asztrociták glutaminsav felvétele az EAAT2 transzporterén keresztül. Az IOS amplitúdójának csökkenése magyarázható a glutaminsav felvétel mediálta sejtduzzadás blokkolásával (Schneider et al., 1992; Han et al., 2004). Az asztrociták szerepét az in vitro afferens ingerlés kiváltotta IOS-ban tovább erősíti a tény, hogy az IOS amplitúdója leginkább a stratum radiatumban csökkent az EAAT2 transzporter blokkolásának hatására, abban a sejtrétegben ahol sok asztrocita található (Bushong et al., 2002; Jinno, 2011). Érdeemes megemlíteni, hogy az in vivo IOS-ban, amit a véráramlás változásához kötnek, szintén kimutatták az asztrociták glutaminsav felvételének szerepét (Gurden et al., 2006). Ez arra utal, hogy az asztrociták szerepet játszanak mind az in vitro, mind az in vivo IOS-ban.

Meglepő módon az IOS mellett a DHK a VSD jel amplitúdóját is csökkentette, ami kétféleképpen magyarázható: i) a neuronális aktivitás mértékének változásában lokális különbségek vannak, és a piramis rétegben mért mezőpotenciál jel nem jellemzi jól a szelet idegi aktivitását, ii) a VSD jelben is szerepet játszik az EAAT2 transzporter aktivitása. Az utóbbi megállapítás mellett szól, hogy Kojima és munkatársai kimutatták, hogy a VSD jel lassú (> 10 ms) komponensében jelen van az asztrogliális glutaminsav transzport (Kojima et al.,

1999). Esetünkben ez a VSD jel integráljának csökkenésében észlelhető, így ebben a tekintetben méréseink megerősítették Kojima és munkatársai eredményeit, a lassú VSD komponenst esetünkben is gátolja a DHK. Viszont az általam használt elemző módszerben a jel amplitúdóját a VSD jel első 5-6 ms-a adja, vagyis ezen gyors időskálán is hatással volt az EAAT2 gátlás a VSD jelre. Ezt erősíti továbbá, hogy a mezőpotenciál mérőelektrod mellett diódán is csökkent a VSD jel amplitúdója DHK hatására, kizárva a térbeli átlagolás hatását. Ez a jelenség többféleképpen magyarázható: 1) a DHK közvetlenül csökkenti az EAAT2 mediálta áramokat a gliasejteken, 2) az EAAT2 gátlása miatt megemelkedett extracelluláris [Glu] miatt csökken a neuronális aktivitás a pre- és extraszinaptikus glutaminsav receptorokon hatva (Lozovaya et al., 2004), illetve fokozódik az interneuronok gátló aktivitása a metabotróp glutaminsav receptorok aktiválása révén (Huang et al., 2004). Az utóbbi eset gyakorlatilag kizárható, ugyanis a PS amplitúdó növekedett a DHK adagolás első 5 percében, ez pedig azt jelzi, hogy a neuronok tüzelése fokozódott.

Az EAAT2 fehérje ugyan kifejeződik neuronokon és számottevő EAAT2 aktivitást is mértek (Schmitt et al., 2002; Chen et al., 2004; Furness et al., 2008), de csupán exogén szubsztráttal (Furness et al., 2008; Zhou et al., 2014), ami fiziológias körülmények között nem feltétlenül releváns. A DHK hatására a VSD jelben látott csökkenést azonban vélhetően az asztrocitákon kifejeződő EAAT2 áramok gátlása okozza, mivel az EAAT2 fehérje több, mint 80%-a a gliasejteken fejeződik ki (Lehre és Danbolt, 1998; Danbolt, 2001; Bjørnsen et al., 2007; Benediktsson et al., 2012; Roberts et al., 2014) és a gliasejtek felelősek a glutaminsav felvétel legnagyobb hányadáért (Bergles és Jahr, 1998; Danbolt, 2001).

Az asztrocitákon létrejövő membránpotenciál változások hozzájárulásának mértéke a mezőpotenciál jelhez a mai napig nem teljesen tisztázott (Buzsáki et al., 2012), az eddigi adatok szerint leginkább a lassú oszcillációk kialakításában vesznek részt (Amzica és Steriade, 2000). Ugyanakkor ismert az is, hogy a gliális EAAT2 transzporter áramok igen gyorsan, a preszinaptikus aktivációt követően 5 ms-on belül detektálhatóak asztrocitákon (Diamond, 2005; Tzingounis és Wadiche, 2007; Dallérac et al., 2013). Annak, hogy hiányosak az információink az asztrociták mezőpotenciál jelhez való hozzájárulásáról valószínűleg technikai okai vannak. Az asztrociták periszinaptikus nyúlványain fejeződnek ki azok a transzporter fehérjék és ioncsatornák, amik a membránpotenciál változások legnagyobb részének létrehozásáért felelősek (Dallérac et al., 2013). Ezeknek a nyúlványok felülete messze meghaladja a fő nyúlványok és a sejtest membránjainak felületét (Hama et al., 2004). Technikai okok miatt viszont ezeken a nyúlványokon végbemenő membránpotenciál változások még a mezőpotenciál méréseknél érzékenyebb patch clamp technikával is alig detektálhatók (Zhou et

al., 2009; Dallérac et al., 2013). Mivel a VSD a sejtmembránhoz közvetlenül kötődik (Peterka et al., 2011), ezért lehetséges, hogy érzékenyebb az asztrociták periszinaptikus nyúlványainak membránjában lejátszódó potenciálváltozásokra, mint a mezőpotenciál mérés.

Mind az EAAT2, mind az ionotróp glutamáterg receptorok hozzájárulása az IOS-hoz és a VSD jelhez regionális differenciát mutatott, amit az IOS/VSD arány szignifikáns különbsége mutat a CA1, CA3 és a DG régiókban. Ez arra utalhat, hogy az ionotróp glutaminsav receptorokat és a glutaminsav transzportereket kifejező plazmás asztrociták (Matthias et al., 2003) hozzájárulása az IOS-hoz és a VSD jelhez régióspecifikus. A VSD jel amplitúdójában lévő regionális különbségek hátterében állhatnak az EAAT2 fehérje expressziójában lévő különbségek. Rothstein és munkatársai homogénnek mondják a fehérje expresszióját a hippokampuszban (Rothstein et al., 1994). Zhang és munkatársai ezzel szemben, Western blot és immunhisztokémiai vizsgálatok alapján azt találták, hogy a CA3-ban és a DG-ben szignifikánsan több EAAT2 fehérje fejeződik ki, mint a CA1-ben (Zhang et al., 2011), viszont sem a western blot, sem az immunhisztokémiai mérések során nem különítették el a neuronon kifejeződő EAAT2 fehérjét a gliálistól. Az EAAT2 promoter aktivitásáról van olyan kvantitatív összehasonlító adat a CA1 és a CA3 régiók között, ahol elkülönítették a neuronokon mérhető aktivitás az asztrocitákétól (de Vivo et al., 2010). De Vivo és munkatársai kimutatták, hogy asztrociták esetében a CA1 minden egyes sejtrétegében nagyobb az EAAT2 promoter aktivitás, mint a CA3 megfelelő sejtrétegében (de Vivo et al., 2010). Ez ellentétes a várakozásainkkal, így ez nem magyarázza az eredményeinket. Neuronok esetében pont fordított összefüggést találtak, a CA3 piramis rétegében nagyobb a transzporter promoterének aktivitása, mint a CA1 piramis rétegben. Ez összhangban van az általam megfigyeltekkel, de ez azért nem valószínű, mert a neuronokban kifejeződő EAAT2 fehérje mennyisége jóval kisebb, mint az asztrocitákon (Danbolt, 2001). Figyelembe kell venni, hogy a fehérje mennyisége és a promoter aktivitás mértéke önmagában nem ad információt a transzporter kapacitásáról. Furness és munkatársai eredményeinek függvényében, miszerint a neuronokon kifejeződő EAAT2 transzporter aktivitás felelős a D-aszpartát felvételének több mint feléért (Furness et al., 2008), nem lehet teljesen kizárni, hogy a neuronális EAAT2 transzporter aktivitás regionális különbsége állna az általam megfigyelt DHK hatás regionális különbsége mögött a VSD jelben. Tehát az irodalmi adatok alapján nem tudjuk egyértelműen eldönteni, hogy vajon a fehérje mennyiségében vagy funkciójában lévő regionális különbségek okozzák-e DHK régiószelektív hatását. Ez a kérdést egy következő munkában szeretnénk tisztázni.

Egy másik magyarázat lehet, hogy a régiók közötti különbséget a DHK hatásban az eltérő típusú aktiválódás (anti- és ortodromikus aktiválódás) okozza. Elképzelhető, hogy az

EAAT2 transzporter hozzájárulása az antidromikus stimulálással kiváltott VSD jelben nagyobb (CA3), míg az ionotróp receptoroké kisebb.

Korábban említettem, hogy az IOS körülbelül 20-25 %-a független az ionotróp glutamáterg aktivitástól, mivel nem gátolható AMPA/kainát és NMDA receptorok antagonistáival. A fennmaradó IOS lehet a preszinaptikus neuronokból felszabaduló asztroglialis glutaminsav felvétel következménye (Wu et al., 2008). Mivel az EAAT2 transzporter gátlása, az AMPA/kainát és NMDA receptorok antagonistáinak egyidejű alkalmazása mellett sem változtatta a fennmaradó IOS-t, ezért valószínűleg nem a preszinaptikus neuronokból felszabaduló glutaminsav asztroglialis felvételének következménye. A fennmaradó IOS forrása lehet más folyamatok következménye, például a duzzadó axonokból nem vezikulárisan felszabaduló ATP (Fields és Ni, 2010; Fields, 2011b, 2011c).

#### **5.4 Az neuronális KCC2 szerepét igazoltam, míg az asztroglialis NKCC1 szerepét kizártam az IOS kialakításában**

Az afferens stimulálással kiváltott in vitro IOS gátolható volt furoszemid alkalmazásával és az extracelluláris klorid koncentráció radikális lecsökkentésével (MacVicar és Hochman, 1991; Holthoff és Witte, 1996). Feltételezték, hogy az IOS főképp a KCl felvétel okozta asztroglialis sejtduzzadást mutatja, ami a furoszemidre érzékeny NKCC1 kotranszporterrel keresztül valósul meg (MacVicar és Hochman, 1991; Holthoff és Witte, 1996). Megismétltem a korábbi extracelluláris klorid koncentráció csökkentésére irányuló kísérleteket az általam használt IOS képalkotási módszerrel. Esetemben az ACSF-ben maradó kloridion koncentrációjával fordított arányban csökkent az IOS amplitúdója, ugyanakkor a mezőpotenciál jel is csökkent az IOS amplitúdójával szinte azonos mértékben. A korábbi munkákban nem közöltek adatot az idegi aktivitás változásáról. Mivel az IOS amplitúdója mellett a mezőpotenciál jel amplitúdója is csökken, ezért az IOS csökkenés kétféleképpen is magyarázható: i) az IOS csökkenése az idegi aktivitás csökkenését követi, ii) a klorid gradiens megzavarása okozza az IOS csökkenését, egyben felveti az anion csatornák és transzporterek szerepét az IOS kialakításában.

A furoszemid a neuronokon expresszáldó KCC2-t is blokkolja az asztrogliaikon kifejeződő NKCC1 mellett és ezek a kotranszporterek a neuronális aktivitás szabályozásában is részt vesznek (Zhu et al., 2008; Viitanen et al., 2010). A kotranszporterek gátlószerei, a furoszemid és a bumetanid epilepsziás rohamok gátlásában is hatékonyak bizonyultak (Gutschmidt et al., 1999; Barbaro et al., 2004). Az általam végzett kísérletekben a furoszemid



két fázisban fejtette ki a hatását a mezőpotenciál jelre. Elsőként növelte a mezőpotenciál jel és a populációs tüske amplitúdóját, valószínűleg a GABA<sub>A</sub> receptor közvetítette klorid áram megfordulási potenciáljának  $E_{GABA}$  eltolása miatt (Huberfeld et al., 2007), viszont az fEPSP meredekségét csökkentette. A második fázisban a mezőpotenciál jel összes paramétere csökkent. Ezek az eredmények magyarázhatók a stimulálással kiváltott extracelluláris kálium koncentráció növekedés mértékének csökkenésével, ami a furoszemid antiepileptikus hatásához is hozzájárul (Gutschmidt et al., 1999). Eredményeim összhangban vannak Gutschmidt és munkatársai eredményeivel (Gutschmidt et al., 1999), mely szerint a furoszemid adagolás első 15 percén belül nőtt a mezőpotenciál jel amplitúdója, majd a további adagolás alatt csökkent. MacVicar és Hochmann megfigyelték, hogy a furoszemid megnöveli a populációs tüskék számát, ami a megnövekedett neuronális aktivitásra utal, de nem írták le kvantitatívan a mezőpotenciál jel amplitúdójának változását, csak annyit állítanak, hogy a furoszemid nem gátolja le teljesen a mezőpotenciál jelet (MacVicar és Hochman, 1991), ebben a tekintetben a méréseim összhangban vannak MacVicar és Hochmann megfigyelésével, mert esetemben sem gátolta le teljesen a furoszemid a mezőpotenciál jelet.

A mezőpotenciál jel amplitúdójával és a PS amplitúdójának növekedésével párhuzamosan nőtt a VSD jel amplitúdója az összes vizsgált régióban, ami azt mutatja, hogy a szelet minden régiójában nőtt az idegi aktivitás. Azt, hogy a VSD jel a hosszabb furoszemid adagolás alatt is magasabb maradt, mint a kontroll, okozhatja az IOS és VSD jelek kiváltásánál alkalmazott eltérő stimulálási protokoll, illetve az is meghúzódhat a háttérben, hogy a VSD jelre kevésbé hat a furoszemid, mint a mezőpotenciál jelre.

A mezőpotenciál jel és a VSD jel amplitúdójával ellentétben a furoszemid csökkentette az IOS amplitúdóját mindkét fázisban. Meglepő módon az NKCC1 specifikus gátlószere, a bumetanid, nem hatott az IOS amplitúdójára, ami kizárja, hogy az NKCC1 lenne a felelős az afferens stimulálás kiváltotta in vitro IOS generálásáért. A VSD jel amplitúdójának változása a CA1-ben követte a mezőpotenciál jel amplitúdójának változását, így valószínűleg a VSD jel kialakításában sem vesz részt az NKCC1.

Ugyanakkor érdemes megjegyezni, hogy a CA3-ban és a DG-ben a VSD jel amplitúdójának változása nem követi a CA1-ben mért mezőpotenciál jel amplitúdójának változását, ami lehet, hogy azért van, mert a mezőpotenciál jel is másképpen változik ezekben a régiókban. Alternatív magyarázat lehet, hogy mivel a VSD jel integrálja szignifikánsan csökken ezekben a régiókban, az asztrociták depolarizációja ezen a transzporterén keresztül közvetlenül hozzájárulhat a VSD jelhez.

A furoszemid és a bumetanid hatása alapján arra következtethetünk, hogy a neuronális aktivitás következtében megnövekedő extracelluláris kálium koncentráció hozzájárul az IOS kialakításához, főként ha figyelembe vesszük az asztroglia sejtek kálium pufferelő kapacitását (Bay és Butt, 2012). A főként neuronokon expresszáldó KCC2 (Rivera et al., 2004) közvetlen hozzájárulását az IOS-hoz sem lehet kizárni, mivel ez a fehérje is transzportál vizet a sejtekbe (MacAulay et al., 2004). Érdeemes megemlíteni, hogy a furoszemid antiepileptikus hatásához sem járul hozzá az NKCC1-en való gátlás (Gutschmidt et al., 1999). Mivel az NKCC1 gátlása (bumetanid alkalmazásával) jelentősen különbözik az NKCC1 és KCC2 együttes gátlásától (furoszemid alkalmazásával) azt mutatja, hogy a furoszemid a neuronális KCC2 gátlásán keresztül hat.

### **5.5 Az asztrociták K<sup>+</sup> pufferelésének hozzájárulása az IOS és VSD jelekhez**

A korábbi irodalmak azt feltételezték, hogy az asztrociták kálium pufferelésének jelentős része az NKCC1-n át valósul meg (Macaulay és Zeuthen, 2012), és mivel az NKCC1 a kálium és klorid ionok mellett vizet is transzportál a sejtbe (Macaulay és Zeuthen, 2012), ezért ezzel a kotranszporterrel asszociálták az IOS kialakulását (MacVicar és Hochman, 1991; Macvicar et al., 2002). Az NKCC1 hozzájárulását az IOS-hoz kizártam, így a furoszemid egyik lehetséges hatásmechanizmusa, hogy mivel gátolja a neuronális aktivitás során bekövetkező extracelluláris [K<sup>+</sup>] emelkedés mértékét, közvetve hat az asztrociták kálium pufferelésére és azon keresztül hat az asztrociták duzzadására. Ezt a hipotézist támogatja Larsen és munkatársainak azon megfigyelése, hogy az NKCC1 nem járul hozzá a kálium ionok extracelluláris térből való eltávolításához (Larsen et al., 2014). Viszont az asztrociták kálium felvétele hozzájárulhat az IOS kialakulásához, más fehérjéken, mint például a K<sub>ir4.1</sub> káliumcsatornán, illetve a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPázon keresztül (Macaulay és Zeuthen, 2012; Larsen et al., 2014).

A K<sub>ir4.1</sub> káliumcsatorna hozzájárulását az IOS-hoz és a VSD jelhez a nem specifikus K<sub>ir4.1</sub> káliumcsatorna inhibitor, BaCl<sub>2</sub> alkalmazásával vizsgáltam. A CA1-ben hasonló hatást figyeltem meg a mezőpotenciál jel és az optikai jelek amplitúdóján a mérőelektrod mellett a diódán, viszont a VSD jel integrálja jelentősen csökkent, mert a VSD jel alakja megváltozott, hasonlóan a DHK és a bumetanid hatásához. A teljes CA1-ben azonban a BaCl<sub>2</sub> nem növelte a VSD amplitúdót, ez arra utalhat, hogy a BaCl<sub>2</sub> a különböző sejtrétegekben eltérően hat, ami tovább erősíti a gliasejtek hozzájárulását a VSD jel létrejöttéhez. Továbbá az IOS/VSD amplitúdó hányados szignifikánsan eltért a CA3 és a DG régiókban, ami a K<sub>ir4.1</sub> káliumcsatorna aktivitás régióként eltérő mértékű hozzájárulását mutatja a CA3 és a DG régiókban. Hasonlóan

a  $K_{ir4.1}$  káliumcsatorna gátlásához, a  $\alpha 2/\beta 2$  alegységet tartalmazó  $Na^+/K^+$ ATPáz gátlása során az optikai jelek amplitúdójának változása követte a mezőpotenciál jel amplitúdójának változását, illetve a regionális különbségek az IOS/VSD hányadosban is hasonlóak voltak. Mivel sem a  $K_{ir4.1}$  káliumcsatorna gátlása, sem a  $Na^+/K^+$ ATPáz gátlása nem különítette el a mezőpotenciál jel és az IOS amplitúdójának változását, ezért, a korábbi feltételezésekkel (Macvicar et al., 2002) ellentétben, az IOS-ban csak kis szerepe van vagy egyáltalán nincs szerepe az asztroglia ezen két membránfehérjén keresztül történő kálium puffereelésének. Ezt támogatja Larsen és munkatársai eredményei is, miszerint az extracelluláris tér térfogatának csökkenését egyik fehérje gátlása sem befolyásolta (Larsen et al., 2014). Mivel az adataink szerint az asztrociták kálium pufferelése a  $Na^+/K^+/Cl^-$  kotranszporterén, a  $K_{ir4.1}$  kálium csatornán és a  $Na^+/K^+$ ATPázon keresztül nem vagy csak kis mértékben járul hozzá az IOS kialakításához, így a furoszemid vagy direkt módon a KCC2 gátlásán keresztül, vagy egyéb fehérje, például a karbonát anhidráz gátlásával hat (Puscas et al., 1999).

A VSD esetében viszont mivel mind a  $BaCl_2$ , mind a ouabain hatására csökken a VSD jel integrálja, ezért a VSD jel lassú komponenséhez valószínűleg hozzájárul az asztroglialis  $K^+$  felvétel a  $K_{ir4.1}$  kálium csatornán és a  $Na^+/K^+$ ATPázon keresztül, ami egyezik a korábbi irodalmi adatokkal (Konnerth et al., 1987). Meg kell jegyezni, hogy az asztrociták kálium puffereelésének hozzájárulása a VSD jel lassú komponenséhez lehet közvetett is, a glutaminsav felvétel befolyásolásán keresztül (Danbolt, 2001), mivel a glutaminsav transzporter aktivitás függ a  $Na^+$  (O’Kane et al., 1999) és a  $K^+$  (Danbolt, 2001) transzmembrán koncentráció gradiensétől. Ezen felül Rose és munkatársai kimutatták, hogy a  $Na^+/K^+$ ATPáz és a glutaminsav transzporterek funkcionális, makromolekuláris komplexet alkotnak (Rose et al., 2009).

Az hogy az IOS/VSD amplitúdó hányados különböző volt a különböző régiókban, többféleképpen is magyarázható: i) a különböző régiókban eltérő az asztrociták fehérjeexpressziós mintázata és fiziológiás működése, ezért ezekben a régiókban a VSD és IOS jelekhez nagyobb mértékben járulnak hozzá ezek a folyamatok, de ezt a lokális mezőpotenciál jel ismerete nélkül nem állíthatjuk teljes bizonyossággal. ii) az aktiváció különbözősége miatt (orto- vs antidromikus aktiválódás), például olyan módon, hogy különböző típusú aktiváció más folyamatokat aktivál az idegi sejtekben (mind az asztrociták, mind a neuronok működése eltérő lehet az aktiváció típusától függően).

## **5.6 Az anion csatornák részt vesznek az IOS és a VSD jel kialakításában**

Egyre több bizonyíték van arra, hogy a sejtek térfogatukat a térfogatváltozás-szabályozta anion csatornán át szabályozzák, ami a sejtek térfogatát csökkenti (Kimelberg et

al., 2006; Benfenati et al., 2009). Kimutatták, hogy a VRAC a sejtből kifelé irányítja (outwardly rectifies) a kloridionokat, és emellett átjárható víz és szerves molekulák, mint például taurin számára is (Eggermont et al., 2001; Nilius, 2004). Leírták ATP felszabadulását a VRAC-on keresztül elektromos ingerléssel kiváltott IOS mérésekben (Fields, 2011a), ami utalhat arra, hogy a VRAC-nak szerepe lehet az IOS kialakításában. Az találtam, hogy a DCPIB, a VRAC specifikus inhibitora a mezőpotenciál jel paramétereire nem hatott, viszont kis mértékben növelte az IOS amplitúdóját. Ez arra utal, hogy a VRAC fiziológias szerepe az IOS lecsengésében van. Érdekes megjegyezni, hogy az NPPB, amit a VRAC potenciális gátlószereként alkalmaznak (Clark et al., 1998; Doughty et al., 1998; Bock et al., 2001; Malekova et al., 2007; Hines et al., 2009; Inoue et al., 2010), méréseimben radikálisan csökkentette a mezőpotenciál jelet és az IOS-t, de mivel a mitokondriumot is depolarizálta az irodalmi adatokkal összhangban (Lukacs et al., 1991), ezért valószínűsítem a DCPIB hatásával összevetve, hogy az NPPB esetében a mitokondrium gátlásán keresztül hatott az IOS-ra. Ez egyben felveti a mitokondriális folyamatok szerepét az IOS-ban, illetve az NPPB hatásának interpretálásakor érdemes figyelembe venni a mitokondriumon való hatását.

Mivel a kloridion koncentráció csökkentése az ACSF-ben csökkentette az IOS-t, ez felveti az anion csatornák szerepét, de mivel ebben az esetben a mezőpotenciál jel paraméterei szintén csökkentek, ebből a mérésből nem lehetett eldönteni, hogy a kloridion koncentráció csökkentés közvetlenül az anion csatornákon, vagy közvetve a mezőpotenciál jel paramétereinek csökkentésén keresztül hat-e, ezért megvizsgáltam a nem specifikus anion csatorna gátló DIDS hatását az IOS-on, a mezőpotenciál és a VSD jelen. A DCPIB-bel ellentétben a DIDS csökkentette az IOS amplitúdóját, ami arra utal, hogy az anion csatornák elősegítik a sejtduzzadást. Az IOS-sal ellentétben a mezőpotenciál jel paraméterei és a neuronális excitabilitás mértéke növekedett DIDS jelenlétében. Mivel a neuronális aktivitás mértéke akkor is növekedett, amikor a whole cell patch clamp konfigurációban az idegsejt intracelluláris kloridion koncentrációját a pipettaoldat határozta meg, illetve a VSD jel amplitúdója is nőtt, ezért arra következtetek, hogy az idegi aktivitás kloridion koncentráció gradienstől független módon növekedett. Ezért a DIDS az IOS-ra valószínűleg az asztrociták anion csatornáin keresztül hat.

A VSD jel amplitúdója növekedett a CA1-ben (20 %-kal), viszont jóval kisebb mértékben, mint a mezőpotenciál jel amplitúdója (91 %-kal). Ez utalhat arra, hogy anion csatornák az IOS-on túl a VSD jelhez is hozzájárulhatnak. Mivel a DIDS az anion csatornákon túl hat a mitokondriális belső membrán anion csatornára (Beavis és Davatol-Hag, 1996), a  $K_{v4.2}$  és  $K_{v4.3}$  kálium csatornákra (Wang et al., 1997), a nátrium függő  $Cl^-/CHO_3^-$  antiporterre (Lai et

al., 1996), és mivel hasonlóan hat az optikai jelekre és a mezőpotenciál jel paraméterei, mint a furoszemid, ezért eredményeink alapján az is felmerülhet, hogy a DIDS-nek és a furoszemidnek közös célmolekulája lehet az asztrocitákon megtalálható bikarbonát transzporter (Florence et al., 2012).

## **5.7 Az IOS térbeli eloszlása és mechanizmusa függ az alkalmazott stimulus típusától**

Kimutattam három fehérje (EAAT2, anion csatornák, VRAC) szerepét az afferens ingerlés kiváltotta IOS kialakításában, amelyekről ismert, hogy szerepük van a sejtduzzadásban is. Ezért felmerül a kérdés, ha sejtduzzadáshoz kapcsolt IOS-t másfajta ingerléssel váltunk ki, akkor hasonló lesz-e a térbeli eloszlása és az időbeli lefutása. Összehasonlítottam a megnövelt káliumkoncentrációval kiváltott IOS és az afferens stimulálás kiváltotta IOS térbeli eloszlását. Mindkét szignál a szelet fényáteresztésének növekedésével járt, ami arra utal, hogy a két szignált kialakító folyamatok hasonlóak lehetnek. A megnövelt extracelluláris káliumion koncentráció depolarizálhatja az idegsejteket (Somjen, 1979), de az én kísérleteimben a megnövelt kálium koncentrációval kiváltott IOS nem mutatott neuronális aktivitás specifikus mintázatot, csak a káliumgradienst tükrözte. A megnövelt kálium koncentrációval kiváltott IOS és az afferens stimulálással kiváltott IOS teljesen eltérő térbeli eloszlást és időbeli lefutást mutatott. A megnövelt kálium koncentrációval kiváltott IOS a kálium adagolás befejeződése után rövid időn belül lecsengett, míg az afferens stimulálás kiváltotta IOS az elektromos ingerlés végéhez képest sokkal később érte el a maximumát. A legszembetűnőbb különbség a két jel lecsengésében van. A megnövelt kálium koncentrációval kiváltott IOS sokkal gyorsabban cseng le, mint az afferens stimulálás kiváltotta IOS. A két jel dinamikájában lévő különbségek hátterében a két szignált kialakító folyamatok közötti különbségek állhatnak. Mindkét jel sejtduzzadást jelez, de a sejtduzzadás mechanizmusa eltérő lehet (glutaminsav felvétel vagy káliumklorid felvétel), ami összhangban van azzal az eredménnyel, hogy az általam vizsgált asztroglialis káliumion pufferelő folyamatoknak csak kis szerepe van az afferens stimulálás kiváltotta IOS kialakításában.

## **5.8 A P2Y<sub>1</sub> receptor nem járul hozzá az IOS kialakításához**

Korábbi munkánkban kimutattuk, hogy az asztrociták az intracelluláris kalcium ion koncentráció emelkedésével válaszolnak ATP adagolás hatására (Molnár et al., 2011b). Molnár és munkatársai eredményei szerint az ATP asztrocitákra a P2Y<sub>1</sub>-es receptoron keresztül hat (Molnár et al., 2011a). Megmutattam, hogy az asztrociták a Schaffer kollaterális ingerlésre is

kalcium jellel válaszolnak, ami mivel TTX-szel blokkolható volt, tehát függ a neuronális aktivitástól. Mivel az IOS egy része sem az ionotróp glutaminsav receptorok, sem a glutaminsav transzporter további blokkolásával nem volt gátolható, ezért felmerül a kérdés, hogy a preszinaptikus neuronokból felszabaduló ATP a P2Y<sub>1</sub> receptoron keresztül hozzájárulhat-e az IOS-hoz. A P2Y<sub>1</sub> receptor gátlása azonos mértékben változtatta meg a mezőpotenciál jel paramétereit, mint az IOS amplitúdóját, ezért valószínűleg ez a receptor a neuronális aktivitás befolyásolásán keresztül hat az IOS-ra. Ezt támogatja az is, hogy a hippocampusban a P2Y<sub>1</sub> receptor a CA1 piramis sejteken is kifejeződik (Morán-Jiménez és Matute, 2000).

## 5.9 Az IOS és a VSD jel feltételezett mechanizmusa

Eredményeim alapján a következő mechanizmust feltételezem az afferens stimulálás kiváltotta IOS kialakulására: elsőként a neuronok aktiválódnak a piramis rétegben, amitől a sejttestjük megduzzad, ezt követi a gliasejtek duzzadása a dendritikus régióban. Ezt a következtetést az is támogatja, hogy az IOS elsőként a piramis rétegben jelenik meg, illetve az, hogy a jel TTX-szel és ionotróp glutaminsav receptor antagonistákkal gátolható. A gliális aktivitáshoz köthető IOS tehát a neuronális aktivitás következtében jelenik meg. A neuronok indukálják a gliasejtek duzzadását glutaminsav kibocsájtásával, ami aktiválja az EAAT2 transzportert és a gliális Mg<sup>2+</sup>-független NMDA receptorokat. A glutaminsav kibocsájtása mellett a neuronok depolarizációja aktiválja a KCC2 kotranszportert, ami megnöveli az extracelluláris kálium és klorid koncentrációt. A korábbi feltételezésekkel ellentétben a KCC2 nem az extracelluláris káliumion koncentráció megnövelésén, hanem valószínűleg a kloridion koncentráció megnövelésével, közvetett módon a bikarbonát transzport, és a kloridion gradiens befolyásolásán keresztül hat az IOS-ra. A glutaminsav és a kloridionok által kiváltott gliális sejtduzzadás aktiválja a VRAC-ot, ami a szignál lecsengéséért felelős. Az IOS kialakításában részt vevő komponensek arra utalnak, hogy az IOS a neuronok és a gliasejtek közötti kommunikációt mutatja.

A főként gliasejt eredetűnek gondolt IOS-ról kimutattam, hogy számottevő neuronális komponense van. Ezzel párhuzamosan eredményeim azt jelzik, hogy az ingerléssel kiváltott, túlnyomórészt neuronális eredetűnek tartott VSD jelet nem releváns a mezőpotenciál térbeli kiterjesztéseként értelmezni. Kimutattam, hogy az EAAT2 transzporterén keresztüli glutaminsav felvétel a VSD jel késői komponensén felül a gyors komponenshez is hozzájárul, míg az NKCC1 kotranszporterén, a K<sub>ir4.1</sub> káliumcsatornán és a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPázon keresztüli asztroglialis kálium felvétel, illetve asztroglialis depolarizáció a VSD jel lassú komponensének létrejöttében játszik szerepet. Emellett megmutattam az anioncsatornák potenciális

kontribúcióját a VSD jelhez. Ezek alapján a VSD jelet nem értelmezhetjük kizárólagosan neuronális eredetűnek, hanem mint ahogy az IOS-nál láttuk a VSD jel is tükrözi az asztrociták és a neuronok közötti gyors kommunikációt.

Munkám során kifejlesztettem az *in vitro* afferens stimulálással kiváltott IOS detektálására alkalmas gyors képalkotási módszert, amivel részletesebb képet kaptam az IOS kialakításában részt vevő sejtes és molekuláris komponensekről. Az IOS-t összehasonlítottam két másik az idegi aktivitás térbeli követésére alkalmas módszerrel a VSD jel képalkotással és szimultán mért mezőpotenciállal, patkány hippocampusz szeletben. Megmutattam, hogy mindhárom jel függ a neuronális aktivitástól, azon belül a jelek nagy része a glutamáterg neuronális aktivitáshoz köthető. Kimutattam, hogy az IOS kialakításában fontos szerepe van a neuronokon expresszálandó KCC2 transzporternek, a gliasejteken kifejeződő EAAT2 transzporternek, az anion csatornáknak, ugyanakkor cáfoltam, hogy az asztrociták kálium puffereelésében részt vevő fehérjéknek, mint az NKCC1,  $K_{ir4.1}$  kálium csatorna és a  $Na^+/K^+$ ATPáz jelentős szerepe lenne az IOS kialakításában. A VSD jel képalkotást a mezőpotenciál térbeli kiterjesztéseként szerettem volna alkalmazni a neuronális aktivitás térképezésére, de mivel megmutattam, hogy a VSD jel gyors és lassú komponensében jelen van az asztrociták glutaminsav, valamint hogy a lassú komponensben jelen van az asztrociták kálium puffereelése ezért, arra következtettem, hogy mindkét optikai jel komplex, az asztrociták és neuronok közötti gyors kommunikációt mutatja. Ezzel a munkával szerettem volna hozzájárulni az idegi aktivitás térbeli követésére szolgáló szignálok komponenseinek részletesebb megismeréséhez, ami *in vivo* kiterjesztve a jövőben távlatokat nyithat az idegrendszer működésének megértéséhez és segítheti a betegségek diagnosztikáját.

## 6 ÖSSZEFOGLALÁS

A feszültségfüggő festék (voltage-sensitive dye, VSD) képalkotás és a belső optikai jel (intrinsic optical signal, IOS) elterjedten használt módszerek az idegi aktivitás tér- és időbeli követésére idegrendszeri hálózatokban. A sejtés és molekuláris komponenseik azonosítása viszont a mai napig nem teljesen tisztázott.

Ennek a kérdésnek a tisztázásához hippocampusz agyszeletben, Schaffer kollaterálisok elektromos ingerlésével kiváltott IOS és VSD jelek tér- és időbeli lefutását követtem nyomon fotodióda mátrix detektorral, amelynek időbeli felbontása lehetővé teszi a szimultán mért mezőpotenciál jellel való összehasonlítást. Az IOS és a VSD jelek kialakításában potenciálisan szerepet játszó neuronális és asztrogliális célpontok részvételének vizsgálata során a várható neuronális komponenseken kívül számos asztrogliális folyamatot azonosítottam, amik hozzájárulnak az IOS és VSD jelek kialakításához. Az IOS és VSD jeleket teljesen megszüntette a feszültségfüggő  $\text{Na}^+$  csatornák gátlása, míg a gátló szinaptikus transzmisszió gátlása  $\text{GABA}_A$  receptor antagonistával jelentős mértékben növelte mindkét jel amplitúdóját. Megállapítottam, hogy mindkét optikai jelet legfőképpen a posztzinaptikus glutaminsav receptor aktiváció inicializálja. Kimutattam, hogy glutaminsav felvétele az asztrogliális EAAT2 transzporterrel jelentős mértékben hozzájárul a VSD jel kialakításához, akár igen rövid ( $< 5$  ms) időintervallumon belül is, jelezve, hogy az asztrociták jelentős mértékben hozzájárulnak a VSD jelhez. A VSD jel mellett az EAAT2 transzporter jelentős szerepét mutattam ki az IOS kialakításában is. Emellett megállapítottam, hogy az IOS kialakításához a  $\text{Mg}^{2+}$ -független NMDA receptorok is hozzájárulhatnak. Az idegsejteken kifejeződő  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  kotranszporter szerepét igazoltam, míg a gliális  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  kotranszporter NKCC1 szerepét kizártam az IOS-ban. Továbbá azonosítottam az anion csatornák, az asztrociták  $\text{K}^+$  felvételének minor szerepét a  $\text{K}_{ir4.1}$  csatornán és az asztrogliális  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázon keresztül az IOS és a VSD jelek kialakításában.

Az eredmények fényében a VSD képalkotás nem tekinthető egyszerűen a mezőpotenciál mérés térbeli kiterjesztésének, kizárólagos neuronális eredettel, hanem az idegsejtek és az asztrociták közötti gyors kommunikációt mutatja. Ezzel ellentétben, a főképp gliális eredetűnek gondolt IOS-ban jelentős neuronális komponens található. Az általam felvázolt elképzelések segíthetnek abban, hogy pontosabban értelmezzük az in vivo mért IOS és VSD jeleket, teret nyitva a diagnosztikai eljárások fejlesztésének a jövőben.



## 7 SUMMARY

Voltage-sensitive dye (VSD) imaging and intrinsic optical signals (IOS) are widely used for monitoring spatiotemporal neural activity in extensive networks. Identification of their major cellular and molecular components, however, has not been concluded yet.

I addressed these issues by imaging spatiotemporal spreading of IOS and VSD transients initiated by Schaffer collateral stimulation in rat hippocampal slices with temporal resolution similar to standard field potential (FP) recordings using a 464-element photodiode-array. By exploring the potential neuronal and astroglial molecular players in VSD and IOS generation, I identified multiple astrocytic processes that significantly contribute to both VSD and IOS signals, in addition to the expected neuronal targets. IOS and VSD signals were eliminated by tetrodotoxin blockade of voltage-gated  $\text{Na}^+$  channels and were significantly enhanced by suppressing inhibitory signaling with GABA<sub>A</sub> receptor antagonist picrotoxin. I found that both optical signals were predominantly initiated by postsynaptic Glu receptor activation.

Glutamate clearance through the astroglial glutamate transporter EAAT2 has been shown to be a major player in VSD generation even in a very short ( $<5$  ms) time-scale, indicating that astrocytes do contribute to the development of spatiotemporal VSD transient. Moreover EAAT2 has been found to be the major component of IOS as well.  $\text{Mg}^{2+}$ -independent astroglial N-methyl-D-aspartate receptors were also found to contribute to IOS. Role for neuronal  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter KCC2, but not for glial  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransporter NKCC1 was observed, therefore IOS has a considerable neuronal component, in contrast to previous conclusion about its predominantly glial origin. In addition, non-specific anion channels, astroglial  $\text{K}^+$  clearance through  $\text{K}_{\text{ir}4.1}$  channel and astroglial  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase also contribute to spatiotemporal IOS and VSD transients to a minor extent.

Therefore, VSD imaging cannot be considered as spatially extended field potential measurement with predominantly neuronal origin, but it also reflects a fast communication between neurons and astrocytes. Conclusively, IOS thought to reflect glial activation has neuronal contribution and the VSD signal with suggested predominantly neuronal origin has astroglial contribution, as observed within the hippocampus. Our model may help to better interpret *in vivo* IOS and VSD signals and may support diagnosis in the future.

## 8 IRODALOM JEGYZÉK

- Aitken PG, Fayuk D, Somjen GG, Turner DA (1999) Use of intrinsic optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods* 18:91–103.
- Akemann W, Mutoh H, Perron A, Park YK, Iwamoto Y, Knöpfel T (2012) Imaging neural circuit dynamics with a voltage-sensitive fluorescent protein. *J Neurophysiol* 108:2323–2337.
- Akemann W, Mutoh H, Perron A, Rossier J, Knöpfel T (2010) Imaging brain electric signals with genetically targeted voltage-sensitive fluorescent proteins. *Nat Methods* 7:643–649.
- Amzica F, Steriade M (2000) Neuronal and glial membrane potentials during sleep and paroxysmal oscillations in the neocortex. *J Neurosci* 20:6648–6665.
- Andersen P, Blackstad TW, Lömo T (1966) Location and identification of excitatory synapses on hippocampal pyramidal cells. *Exp Brain Res* 1:236–248.
- Andersen P, Bliss TVP, Skrede KK (1971a) Unit analysis of hippocampal population spikes. *Exp Brain Res* 13.
- Andersen P, Bliss T V, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK (1971b) Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand* 76:4A – 5A.
- Anderson WW, Collingridge GL (2001) The LTP Program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. *J Neurosci Methods* 108:71–83.
- Andreassen M, Skov J, Nedergaard S (2007) Inwardly rectifying K<sup>+</sup> (Kir) channels antagonize ictal-like epileptiform activity in area CA1 of the rat hippocampus. *Hippocampus* 17:1037–1048.
- Andrew RD, Jarvis CR, Obeidat a S (1999) Potential sources of intrinsic optical signals imaged in live brain slices. *Methods* 18:185–196, 179.
- Andrew RD, MacVicar BA (1994) Imaging cell volume changes and neuronal excitation in the hippocampal slice. *Neuroscience* 62:371–383.
- Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG (1994) Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci* 14:5559–5569.
- Ba AM, Guiou M, Pouratian N, Muthialu A, Rex DE, Cannestra AF, Chen JWY, Toga AW (2002) Multiwavelength optical intrinsic signal imaging of cortical spreading depression. *J Neurophysiol* 88:2726–2735.
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98:641–653.

- Baker BJ, Lee H, Pieribone VA, Cohen LB, Isacoff EY, Knopfel T, Kosmidis EK (2007) Three fluorescent protein voltage sensors exhibit low plasma membrane expression in mammalian cells. *J Neurosci Methods* 161:32–38.
- Balena T, Acton B a, Koval D, Woodin M a (2008) Extracellular potassium regulates the chloride reversal potential in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 1205:12–20.
- Balestrino M, Aitken PG, Somjen GG (1986) The effects of moderate changes of extracellular  $K^+$  and  $Ca^{2+}$  on synaptic and neural function in the CA1 region of the hippocampal slice. *Brain Res* 377:229–239.
- Barbaro NM, Takahashi DK, Baraban SC (2004) A potential role for astrocytes in mediating the antiepileptic actions of furosemide in vitro. *Neuroscience* 128:655–663.
- Barbarosie M, Avoli M (1997) CA3-driven hippocampal-entorhinal loop controls rather than sustains in vitro limbic seizures. *J Neurosci* 17:9308–9314.
- Bauer AQ, Kraft AW, Wright PW, Snyder AZ, Lee J-M, Culver JP (2014) Optical imaging of disrupted functional connectivity following ischemic stroke in mice. *Neuroimage* 99C:388–401.
- Bay V, Butt AM (2012) Relationship between glial potassium regulation and axon excitability: a role for glial Kir4.1 channels. *Glia* 60:651–660.
- Beavis AD, Davatol-Hag H (1996) The mitochondrial inner membrane anion channel is inhibited by DIDS. *J Bioenerg Biomembr* 28:207–214.
- Benediktsson AM, Marrs GS, Tu JC, Worley PF, Rothstein JD, Bergles DE, Dailey ME (2012) Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia* 60:175–188.
- Benfenati V, Caprini M, Nicchia GP, Rossi A, Dovizio M, Cervetto C, Nobile M, Ferroni S (2009) Carbenoxolone inhibits volume-regulated anion conductance in cultured rat cortical astroglia. *Channels (Austin)* 3:323–336.
- Benson DL, Watkins FH, Steward O, Banker G (1994) Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. *J Neurocytol* 23:279–295.
- Berdondini L, Imfeld K, Maccione A, Tedesco M, Neukom S, Koudelka-Hep M, Martinoia S (2009) Active pixel sensor array for high spatio-temporal resolution electrophysiological recordings from single cell to large scale neuronal networks. *Lab Chip* 9:2644–2651.
- Bergles DE, Jahr CE (1998) Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J Neurosci* 18:7709–7716.
- Betourne A, Bertholet AM, Labroue E, Halley H, Sun HS, Lorsignol A, Feng Z-P, French RJ, Penicaud L, Lassalle J-M, Frances B (2009) Involvement of hippocampal CA3  $K(ATP)$  channels in contextual memory. *Neuropharmacology* 56:615–625.

- Bjørnsen LP, Eid T, Holmseth S, Danbolt NC, Spencer DD, de Lanerolle NC (2007) Changes in glial glutamate transporters in human epileptogenic hippocampus: inadequate explanation for high extracellular glutamate during seizures. *Neurobiol Dis* 25:319–330.
- Bock a, Krieger-Liszkay A, Beitia Ortiz de Zarate I, Schönknecht G (2001) Cl<sup>-</sup> channel inhibitors of the arylaminobenzoate type act as photosystem II herbicides: a functional and structural study. *Biochemistry* 40:3273–3281.
- Borbély S, Körössi C, Somogyvári Z, Világi I (2014) In vitro intrinsic optical imaging can be used for source determination in cortical slices. *Eur J Neurosci* 39:72–82.
- Brines ML, Robbins RJ (1993) Cell-type specific expression of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase catalytic subunits in cultured neurons and glia: evidence for polarized distribution in neurons. *Brain Res* 631:1–11.
- Buchheim K, Wessel O, Siegmund H, Schuchmann S, Meierkord H (2005) Processes and components participating in the generation of intrinsic optical signal changes in vitro. *Eur J Neurosci* 22:125–132.
- Bushong E a, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183–192.
- Butt AM, Kalsi A (2006) Inwardly rectifying potassium channels (Kir) in central nervous system glia: a special role for Kir4.1 in glial functions. *J Cell Mol Med* 10:33–44.
- Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C (2012) The origin of extracellular fields and currents--EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci* 13:407–420.
- Cannestra AF, Pouratian N, Forage J, Bookheimer SY, Martin NA, Toga AW (2004) Functional magnetic resonance imaging and optical imaging for dominant-hemisphere perisylvian arteriovenous malformations. *Neurosurgery* 55:804–812; discussion 812–814.
- Cerne R, Haglund MM (2002) Electrophysiological correlates to the intrinsic optical signal in the rat neocortical slice. *Neurosci Lett* 317:147–150.
- Chang PY, Jackson MB (2003) Interpretation and optimization of absorbance and fluorescence signals from voltage-sensitive dyes. *J Membr Biol* 196:105–116.
- Chemla S, Chavane F (2010) Voltage-sensitive dye imaging: Technique review and models. *J Physiol Paris* 104:40–50.
- Chen L, Sokabe M (2005) Presynaptic modulation of synaptic transmission by pregnenolone sulfate as studied by optical recordings. *J Neurophysiol* 94:4131–4144.
- Chen W, Mahadomrongkul V, Berger U V, Bassan M, DeSilva T, Tanaka K, Irwin N, Aoki C, Rosenberg P a (2004) The glutamate transporter GLT1a is expressed in excitatory axon terminals of mature hippocampal neurons. *J Neurosci* 24:1136–1148.
- Chen-Bee CH, Agoncillo T, Lay CC, Frostig RD (2010) Intrinsic signal optical imaging of brain function using short stimulus delivery intervals. *J Neurosci Methods* 187:171–182.

- Chever O, Djukic B, McCarthy KD, Amzica F (2010) Implication of  $K_{ir4.1}$  channel in excess potassium clearance: an in vivo study on anesthetized glial-conditional  $K_{ir4.1}$  knock-out mice. *J Neurosci* 30:15769–15777.
- Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7:357–368.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171–182.
- Cholet N, Pellerin L, Magistretti PJ, Hamel E (2002) Similar perisynaptic glial localization for the  $Na^+, K^+$ -ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. *Cereb Cortex* 12:515–525.
- Chow DC, Forte JG (1995) Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases. *J Exp Biol* 198:1–17.
- Clark S, Jordt SE, Jentsch TJ, Mathie A (1998) Characterization of the hyperpolarization-activated chloride current in dissociated rat sympathetic neurons. *J Physiol* 506 ( Pt 3:665–678.
- Cohen LB (1973) Changes in neuron structure during action potential propagation and synaptic transmission. *Physiol Rev* 53:373–418.
- Colgin LL, Kubota D, Brucher F a, Jia Y, Branyan E, Gall CM, Lynch G (2004) Spontaneous waves in the dentate gyrus of slices from the ventral hippocampus. *J Neurophysiol* 92:3385–3398.
- Coulter DA, Eid T (2012) Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia* 60:1215–1226.
- Crambert G, Geering K (2003) FXYD proteins: new tissue-specific regulators of the ubiquitous  $Na^+, K^+$ -ATPase. *Sci STKE* 2003:RE1.
- Crambert G, Hasler U, Beggah AT, Yu C, Modyanov NN, Horisberger JD, Lelièvre L, Geering K (2000) Transport and pharmacological properties of nine different human  $Na^+, K^+$ -ATPase isozymes. *J Biol Chem* 275:1976–1986.
- Dallérac G, Chever O, Rouach N (2013) How do astrocytes shape synaptic transmission? Insights from electrophysiology. *Front Cell Neurosci* 7:159.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1–105.
- Das A, Gilbert CD (1995) Long-range horizontal connections and their role in cortical reorganization revealed by optical recording of cat primary visual cortex. *Nature* 375:780–784.
- Day M, Carr DB, Ulrich S, Ilijic E, Tkatch T, Surmeier DJ (2005) Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN,  $K_{ir2}$ , and  $K_{leak}$  channels. *J Neurosci* 25:8776–8787.

- De Vivo L, Melone M, Rothstein JD, Conti F (2010) GLT-1 Promoter Activity in Astrocytes and Neurons of Mouse Hippocampus and Somatic Sensory Cortex. *Front Neuroanat* 3:31.
- Deitmer JW, Rose CR (2010) Ion changes and signalling in perisynaptic glia. *Brain Res Rev* 63:113–129.
- Devor A, Dunn AK, Andermann ML, Ulbert I, Boas DA, Dale AM (2003) Coupling of total hemoglobin concentration, oxygenation, and neural activity in rat somatosensory cortex. *Neuron* 39:353–359.
- Diamond JS (2005) Deriving the glutamate clearance time course from transporter currents in CA1 hippocampal astrocytes: transmitter uptake gets faster during development. *J Neurosci* 25:2906–2916.
- Djukic B, Casper KB, Philpot BD, Chin L-S, McCarthy KD (2007) Conditional knock-out of Kir4.1 leads to glial membrane depolarization, inhibition of potassium and glutamate uptake, and enhanced short-term synaptic potentiation. *J Neurosci* 27:11354–11365.
- Dobretsov M, Stimers JR (2005) Neuronal function and  $\alpha 3$  isoform of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. *Front Biosci* 10:2373–2396.
- Doty HU, D’Arcangelo G, Pestel E, Zieglgänsberger W (1996) The spread of excitation in neocortical columns visualized with infrared-darkfield videomicroscopy. *Neuroreport* 7:1553–1558.
- Doty HU, Zieglgänsberger W (1998) Visualization of neuronal form and function in brain slices by infrared videomicroscopy. *Histochem J* 30:141–152.
- Dong X, Wang Y, Qin Z (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 30:379–387.
- Doughty JM, Miller a L, Langton PD (1998) Non-specificity of chloride channel blockers in rat cerebral arteries: block of the L-type calcium channel. *J Physiol* 507 ( Pt 2:433–439.
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ (2005) NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11:1205–1213.
- Ebner TJ, Chen G (1995) Use of voltage-sensitive dyes and optical recordings in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 46:463–506.
- Eggermont J, Trouet D, Carton I, Nilius B (2001) Cellular function and control of volume-regulated anion channels. *Cell Biochem Biophys* 35:263–274.
- Ehrenberg B, Montana V, Wei MD, Wuskell JP, Loew LM (1988) Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J* 53:785–794.

- Fayuk D, Aitken PG, Somjen GG, Turner D a (2002) Two different mechanisms underlie reversible, intrinsic optical signals in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87:1924–1937.
- Federico P, Borg SG, Salkauskus AG, MacVicar BA (1994) Mapping patterns of neuronal activity and seizure propagation by imaging intrinsic optical signals in the isolated whole brain of the guinea-pig. *Neuroscience* 58:461–480.
- Fields RD (2011a) Imaging single photons and intrinsic optical signals for studies of vesicular and non-vesicular ATP release from axons. *Front Neuroanat* 5:32.
- Fields RD (2011b) Nonsynaptic and nonvesicular ATP release from neurons and relevance to neuron-glia signaling. *Semin Cell Dev Biol* 22:214–219.
- Fields RD (2011c) Signaling by neuronal swelling. *Sci Signal* 4:tr1.
- Fields RD, Ni Y (2010) Nonsynaptic communication through ATP release from volume-activated anion channels in axons. *Sci Signal* 3:ra73.
- Florence CM, Baillie LD, Mulligan SJ (2012) Dynamic volume changes in astrocytes are an intrinsic phenomenon mediated by bicarbonate ion flux. *PLoS One* 7:e51124.
- Franke F, Jäckel D, Dragas J, Müller J, Radivojevic M, Bakkum D, Hierlemann A (2012) High-density microelectrode array recordings and real-time spike sorting for closed-loop experiments: an emerging technology to study neural plasticity. *Front Neural Circuits* 6:105.
- Freund TF, Buzsáki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6:347–470.
- Frostig RD, Lieke EE, Ts'o DY, Grinvald A (1990) Cortical functional architecture and local coupling between neuronal activity and the microcirculation revealed by in vivo high-resolution optical imaging of intrinsic signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6082–6086.
- Furness DN, Dehnes Y, Akhtar AQ, Rossi DJ, Hamann M, Grutle NJ, Gundersen V, Holmseth S, Lehre KP, Ullensvang K, Wojewodzic M, Zhou Y, Attwell D, Danbolt NC (2008) A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience* 157:80–94.
- Gibor G, Yakubovich D, Peretz A, Attali B (2004) External barium affects the gating of KCNQ1 potassium channels and produces a pore block via two discrete sites. *J Gen Physiol* 124:83–102.
- González JE, Tsien RY (1995) Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells. *Biophys J* 69:1272–1280.
- Grewer C, Gameiro A, Zhang Z, Tao Z, Braams S, Rauen T (2008) Glutamate forward and reverse transport: from molecular mechanism to transporter-mediated release after ischemia. *IUBMB Life* 60:609–619.

- Grinvald A, Mankner A, Segal M (1982) Visualization of the spread of electrical activity in rat hippocampal slices by voltage-sensitive optical probes. *J Physiol* 333:269–291.
- Grinvald A, Shoham D, Shmuel A (1999) In-vivo optical imaging of cortical architecture and dynamics. *Mod Tech Neurosci Res*.
- Gulyás A I, Siki A, Payne J A, Kaila K, Freund TF (2001) The KCl cotransporter, KCC2, is highly expressed in the vicinity of excitatory synapses in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 13:2205–2217.
- Gurden H, Uchida N, Mainen ZF (2006) Sensory-evoked intrinsic optical signals in the olfactory bulb are coupled to glutamate release and uptake. *Neuron* 52:335–345.
- Gustavsson A et al. (2011) Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21:718–779.
- Gutschmidt KU, Stenkamp K, Buchheim K, Heinemann U, Meierkord H (1999) Anticonvulsant actions of furosemide in vitro. *Neuroscience* 91:1471–1481.
- Haas B, Schipke CG, Peters O, Söhl G, Willecke K, Kettenmann H (2006) Activity-dependent ATP-waves in the mouse neocortex are independent from astrocytic calcium waves. *Cereb Cortex* 16:237–246.
- Haas M (1994) The Na-K-Cl cotransporters. *Am J Physiol* 267:C869–C885.
- Haglund MM (2012) Optical imaging of visual cortex epileptic foci and propagation pathways. *Epilepsia* 53 Suppl 1:87–97.
- Haglund MM, Hochman DW (2004) Optical imaging of epileptiform activity in human neocortex. *Epilepsia* 45 Suppl 4:43–47.
- Haglund MM, Meno JR, Hochman DW, Ngai AC, Winn HR (2008) Correlation of intrinsic optical signal, cerebral blood flow, and evoked potentials during activation of rat somatosensory cortex. *J Neurosurg* 109:654–663.
- Haj-Yasein NN, Jensen V, Vindedal GF, Gundersen GA, Klungland A, Ottersen OP, Hvalby O, Nagelhus EA (2011) Evidence that compromised K<sup>+</sup> spatial buffering contributes to the epileptogenic effect of mutations in the human K<sub>ir4.1</sub> gene (KCNJ10). *Glia* 59:1635–1642.
- Hama K, Arai T, Katayama E, Marton M, Ellisman MH (2004) Tri-dimensional morphometric analysis of astrocytic processes with high voltage electron microscopy of thick Golgi preparations. *J Neurocytol* 33:277–285.
- Han BC, Koh SB, Lee EY, Seong YH (2004) Regional difference of glutamate-induced swelling in cultured rat brain astrocytes. *Life Sci* 76:573–583.
- Hansson E, Muyderman H, Leonova J, Allansson L, Sinclair J, Blomstrand F, Thorlin T, Nilsson M, Rönnbäck L (2000) Astroglia and glutamate in physiology and pathology: aspects on glutamate transport, glutamate-induced cell swelling and gap-junction communication. *Neurochem Int* 37:317–329.



- Hertz L (1966) Neuroglial localization of potassium and sodium effects on respiration in brain. *J Neurochem* 13:1373–1387.
- Hertz L, Xu J, Song D, Yan E, Gu L, Peng L (2013) Astrocytic and neuronal accumulation of elevated extracellular  $K^+$  with a  $2/3 K^+/Na^+$  flux ratio-consequences for energy metabolism, osmolarity and higher brain function. *Front Comput Neurosci* 7:114.
- Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev* 90:291–366.
- Hill MRH, Greenfield S a (2013) Characterization of early cortical population response to thalamocortical input in vitro. *Front Neurosci* 7:273.
- Hines DJ, Hines RM, Mulligan SJ, Macvicar BA (2009) Microglia processes block the spread of damage in the brain and require functional chloride channels. *Glia* 57:1610–1618.
- Holthoff K, Witte OW (1996) Intrinsic optical signals in rat neocortical slices measured with near-infrared dark-field microscopy reveal changes in extracellular space. *J Neurosci* 16:2740–2749.
- Holthoff K, Witte OW (1998) Intrinsic optical signals in vitro: a tool to measure alterations in extracellular space with two-dimensional resolution. *Brain Res Bull* 47:649–655.
- Holtkamp M, Buchheim K, Elsner M, Matzen J, Weissinger F, Meierkord H (2011) Status epilepticus induces increasing neuronal excitability and hypersynchrony as revealed by optical imaging. *Neurobiol Dis* 43:220–227.
- Huang YH, Sinha SR, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE (2004) Astrocyte glutamate transporters regulate metabotropic glutamate receptor-mediated excitation of hippocampal interneurons. *J Neurosci* 24:4551–4559.
- Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, Rivera C (2007) Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 27:9866–9873.
- Ikrar T, Guo N, He K, Besnard A, Levinson S, Hill A, Lee H-K, Hen R, Xu X, Sahay A (2013) Adult neurogenesis modifies excitability of the dentate gyrus. *Front Neural Circuits* 7:204.
- Inanobe A, Fujita A, Ito M, Tomoike H, Inageda K, Kurachi Y (2002) Inward rectifier  $K^+$  channel Kir2.3 is localized at the postsynaptic membrane of excitatory synapses. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C1396–C1403.
- Inoue H, Takahashi N, Okada Y, Konishi M (2010) Volume-sensitive outwardly rectifying chloride channel in white adipocytes from normal and diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 298:C900–C909.
- Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov S V, Stewart CL, Fields RD (2006) Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49:823–832.

- Jarvis CR, Lilge L, Vipond GJ, Andrew RD (1999) Interpretation of intrinsic optical signals and calcein fluorescence during acute excitotoxic insult in the hippocampal slice. *Neuroimage* 10:357–372.
- Jiang J, Eisenthal KB, Yuste R (2007) Second harmonic generation in neurons: electro-optic mechanism of membrane potential sensitivity. *Biophys J* 93:L26–L28.
- Jin W, Zhang R-J, Wu J (2002) Voltage-sensitive dye imaging of population neuronal activity in cortical tissue. *J Neurosci Methods* 115:13–27.
- Jinno S (2011) Regional and laminar differences in antigen profiles and spatial distributions of astrocytes in the mouse hippocampus, with reference to aging. *Neuroscience* 180:41–52.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J (1999) Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25–34.
- Kahle KT, Simard JM, Staley KJ, Nahed B V, Jones PS, Sun D (2009) Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)* 24:257–265.
- Kahle KT, Staley KJ, Nahed B V, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount DB (2008) Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol* 4:490–503.
- Kajikawa Y, Schroeder CE (2011) How local is the local field potential? *Neuron* 72:847–858.
- Kann O, Kovács R (2007) Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 292:C641–C657.
- Katzner S, Nauhaus I, Benucci A, Bonin V, Ringach DL, Carandini M (2009) Local origin of field potentials in visual cortex. *Neuron* 61:35–41.
- Kawauchi S, Sato S, Ooigawa H, Nawashiro H, Ishihara M, Kikuchi M (2009) Light scattering change precedes loss of cerebral adenosine triphosphate in a rat global ischemic brain model. *Neurosci Lett* 459:152–156.
- Kew JNC, Davies C (2009) Kir family. In: *Ion Channels: From Structure to Function*.
- Kimelberg HK, Frangakis M V (1985) Furosemide- and bumetanide-sensitive ion transport and volume control in primary astrocyte cultures from rat brain. *Brain Res* 361:125–134.
- Kimelberg HK, Macvicar BA, Sontheimer H (2006) Anion channels in astrocytes: Biophysics, pharmacology, and function. *Glia* 54:747–757.
- Kivi A, Lehmann TN, Kovács R, Eilers A, Jauch R, Meencke HJ, von Deimling A, Heinemann U, Gabriel S (2000) Effects of barium on stimulus-induced rises of  $[K^+]_o$  in human epileptic non-sclerotic and sclerotic hippocampal area CA1. *Eur J Neurosci* 12:2039–2048.

- Kofuji P, Newman EA (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1045–1056.
- Kohn A, Metz C, Quibrera M, Tommerdahl M a, Whitsel BL (2000) Functional neocortical microcircuitry demonstrated with intrinsic signal optical imaging in vitro. *Neuroscience* 95:51–62.
- Kojima S, Nakamura T, Nidaira T, Nakamura K, Ooashi N, Ito E, Watase K, Tanaka K, Wada K, Kudo Y, Miyakawa H (1999) Optical detection of synaptically induced glutamate transport in hippocampal slices. *J Neurosci* 19:2580–2588.
- Konnerth A, Obaid AL, Salzberg BM (1987) Optical recording of electrical activity from parallel fibres and other cell types in skate cerebellar slices in vitro. *J Physiol* 393:681–702.
- Korn SJ, Giacchino JL, Chamberlin NL, Dingledine R (1987) Epileptiform burst activity induced by potassium in the hippocampus and its regulation by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol* 57:325–340.
- Kovács R, Kardos J, Heinemann U, Kann O (2005) Mitochondrial calcium ion and membrane potential transients follow the pattern of epileptiform discharges in hippocampal slice cultures. *J Neurosci* 25:4260–4269.
- Kreisman NR, Smith ML (1993) Potassium-induced changes in excitability in the hippocampal CA1 region of immature and adult rats. *Brain Res Dev Brain Res* 76:67–73.
- Kremer Y, Léger J-F, Goodman D, Brette R, Bourdieu L (2011) Late emergence of the vibrissa direction selectivity map in the rat barrel cortex. *J Neurosci* 31:10689–10700.
- Kuo IY-T, Wölfle SE, Hill CE (2011) T-type calcium channels and vascular function: the new kid on the block? *J Physiol* 589:783–795.
- Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 115:157–188.
- Lai ZF, Liu J, Nishi K (1996) Effects of stilbene derivatives SITS and DIDS on development of intracellular acidosis during ischemia in isolated guinea pig ventricular papillary muscle in vitro. *Jpn J Pharmacol* 72:161–174.
- Larsen BR, Assentoft M, Cotrina ML, Hua SZ, Nedergaard M, Kaila K, Voipio J, Macaulay N (2014) Contributions of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, NKCC1, and Kir4.1 to hippocampal K<sup>+</sup> clearance and volume responses. *Glia*.
- Lasztóczy B, Nyitrai G, Héja L, Kardos J (2009) Synchronization of GABAergic inputs to CA3 pyramidal cells precedes seizure-like event onset in juvenile rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 102:2538–2553.
- Lehre KP, Danbolt NC (1998) The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J Neurosci* 18:8751–8757.

- Li B, Hertz L, Peng L (2013) Cell-specific mRNA alterations in Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms and FXYD in mice treated chronically with carbamazepine, an anti-bipolar drug. *Neurochem Res* 38:834–841.
- Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM (2007) Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus* 22:E2.
- Liu M-G, Lu D, Wang Y, Chen X-F, Li Z, Xu Y, Jin J-H, Wang R-R, Chen J (2012) Counteracting roles of metabotropic glutamate receptor subtypes 1 and 5 in regulation of pain-related spatial and temporal synaptic plasticity in rat entorhinal-hippocampal pathways. *Neurosci Lett* 507:38–42.
- Liu P, Chalak LF, Lu H (2014) Non-invasive assessment of neonatal brain oxygen metabolism: A review of newly available techniques. *Early Hum Dev*.
- Loreaux EL, Kaul B, Lorenz JN, Lingrel JB (2008) Ouabain-Sensitive  $\alpha 1$  Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase enhances natriuretic response to saline load. *J Am Soc Nephrol* 19:1947–1954.
- Lozovaya N, Melnik S, Tsintsadze T, Grebenyuk S, Kirichok Y, Krishtal O (2004) Protective cap over CA1 synapses: extrasynaptic glutamate does not reach the postsynaptic density. *Brain Res* 1011:195–205.
- Lukacs GL, Nanda A, Rotstein OD, Grinstein S (1991) The chloride channel blocker 5-nitro-2-(3-phenylpropyl-amino) benzoic acid (NPPB) uncouples mitochondria and increases the proton permeability of the plasma membrane in phagocytic cells. *FEBS Lett* 288:17–20.
- Luo W, Li P, Chen S, Zeng S, Luo Q (2007) Differentiating hemodynamic responses in rat primary somatosensory cortex during non-noxious and noxious electrical stimulation by optical imaging. *Brain Res* 1133:67–77.
- MacAulay N, Gether U, Klaerke DA, Zeuthen T (2001) Water transport by the human Na<sup>+</sup>-coupled glutamate cotransporter expressed in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 530:367–378.
- MacAulay N, Hamann S, Zeuthen T (2004) Water transport in the brain: role of cotransporters. *Neuroscience* 129:1031–1044.
- Macaulay N, Zeuthen T (2012) Glial K<sup>+</sup> clearance and cell swelling: key roles for cotransporters and pumps. *Neurochem Res* 37:2299–2309.
- MacVicar B, Hochman D (1991) Imaging of synaptically evoked intrinsic optical signals in hippocampal slices. *J Neurosci* 11:1458–1469.
- Macvicar BA, Feighan D, Brown A, Ransom B (2002) Intrinsic optical signals in the rat optic nerve: Role for K<sup>+</sup> uptake via NKCC1 and swelling of astrocytes. *Glia* 37:114–123.
- Mainero C, Louapre C (2014) Migraine and inhibitory system - I can't hold it! *Curr Pain Headache Rep* 18:426.
- Majander A, Wikström M (1989) The plasma membrane potential of human neutrophils. Role of ion channels and the sodium/potassium pump. *Biochim Biophys Acta* 980:139–145.

- Malekova L, Tomaskova J, Novakova M, Stefanik P, Kopacek J, Lakatos B, Pastorekova S, Krizanova O, Breier A, Ondrias K (2007) Inhibitory effect of DIDS, NPPB, and phloretin on intracellular chloride channels. *Pflugers Arch* 455:349–357.
- Maljevic S, Lerche H (2013) Potassium channels: a review of broadening therapeutic possibilities for neurological diseases. *J Neurol* 260:2201–2211.
- Mané M, Müller M (2012) Temporo-spectral imaging of intrinsic optical signals during hypoxia-induced spreading depression-like depolarization. *PLoS One* 7:e43981.
- Masino SA, Frostig RD (1996) Quantitative long-term imaging of the functional representation of a whisker in rat barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4942–4947.
- Massieu L, Morales-Villagrán A, Tapia R (1995) Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem* 64:2262–2272.
- Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Hüttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhäuser C (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 23:1750–1758.
- Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB (1984) Voltage-dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 309:261–263.
- Mc Loughlin NP, Blasdel GG (1998) Wavelength-dependent differences between optically determined functional maps from macaque striate cortex. *Neuroimage* 7:326–336.
- McGrail KM, Phillips JM, Sweadner KJ (1991) Immunofluorescent localization of three  $Na^+, K^+$ -ATPase isozymes in the rat central nervous system: both neurons and glia can express more than one Na,K-ATPase. *J Neurosci* 11:381–391.
- Meeks JP, Mennerick S (2007a) Astrocyte membrane responses and potassium accumulation during neuronal activity. *Hippocampus* 17:1100–1108.
- Meeks JP, Mennerick S (2007b) Action potential initiation and propagation in CA3 pyramidal axons. *J Neurophysiol* 97:3460–3472.
- Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL (2013) Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698:6–18.
- Molnár T, Dobolyi A, Nyitrai G, Barabás P, Héja L, Emri Z, Palkovits M, Kardos J (2011a) Calcium signals in the nucleus accumbens: activation of astrocytes by ATP and succinate. *BMC Neurosci* 12:96.
- Molnár T, Héja L, Emri Z, Simon A, Nyitrai G, Pál I, Kardos J (2011b) Activation of astroglial calcium signaling by endogenous metabolites succinate and gamma-hydroxybutyrate in the nucleus accumbens. *Front Neuroenergetics* 3:7.

- Momose-Sato Y, Sato K, Arai Y, Yazawa I, Mochida H, Kamino K (1999) Evaluation of voltage-sensitive dyes for long-term recording of neural activity in the hippocampus. *J Membr Biol* 172:145–157.
- Morán-Jiménez MJ, Matute C (2000) Immunohistochemical localization of the P2Y<sub>1</sub> purinergic receptor in neurons and glial cells of the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 78:50–58.
- Moser MB, Moser EI (1998) Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 8:608–619.
- Müller M, Somjen GG (1999) Intrinsic optical signals in rat hippocampal slices during hypoxia-induced spreading depression-like depolarization. *J Neurophysiol* 82:1818–1831.
- Narayan SM, Santori EM, Blood AJ, Burton JS, Toga AW (1994a) Imaging optical reflectance in rodent barrel and forelimb sensory cortex. *Neuroimage* 1:181–190.
- Narayan SM, Santori EM, Toga AW (1994b) Mapping functional activity in rodent cortex using optical intrinsic signals. *Cereb cortex* 4:195–204.
- Nicholls DG (2006) Simultaneous monitoring of ionophore- and inhibitor-mediated plasma and mitochondrial membrane potential changes in cultured neurons. *J Biol Chem* 281:14864–14874.
- Nichols M, Townsend N, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P RM (2012) European cardiovascular disease statistics 2012 (Susanne Løgstrup SO, ed)., 2012th ed. Brussels: European Heart Network.
- Nilius B (2004) Is the volume-regulated anion channel VRAC a “water-permeable” channel? *Neurochem Res* 29:3–8.
- Nyitrai G, Héja L, Jablonkai I, Pál I, Visy J, Kardos J (2013) Polyamidoamine dendrimer impairs mitochondrial oxidation in brain tissue. *J Nanobiotechnology* 11:9.
- Nyitrai G, Kékesi KA, Juhász G (2006) Extracellular level of GABA and Glu: in vivo microdialysis-HPLC measurements. *Curr Top Med Chem* 6:935–940.
- Nyitrai G, Lasztóczy B, Kardos J (2010) Glutamate uptake shapes low-[Mg<sup>2+</sup>] induced epileptiform activity in juvenile rat hippocampal slices. *Brain Res* 1309:172–178.
- O’Brien WJ, Lingrel JB, Wallick ET (1994) Ouabain binding kinetics of the rat alpha two and alpha three isoforms of the sodium-potassium adenosine triphosphate. *Arch Biochem Biophys* 310:32–39.
- O’Kane RL, Martínez-López I, DeJoseph MR, Viña JR, Hawkins RA (1999) Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem* 274:31891–31895.
- Olsen ML, Higashimori H, Campbell SL, Hablitz JJ, Sontheimer H (2006) Functional expression of K<sub>ir4.1</sub> channels in spinal cord astrocytes. *Glia* 53:516–528.

- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol* 29:788–806.
- Otis TS (2001) Vesicular glutamate transporters in cognition. *Neuron* 29:11–14.
- Palmer MJ, Taschenberger H, Hull C, Tremere L, von Gersdorff H (2003) Synaptic activation of presynaptic glutamate transporter currents in nerve terminals. *J Neurosci* 23:4831–4841.
- Pasantes-Morales H, Schousboe A (1989) Release of taurine from astrocytes during potassium-evoked swelling. *Glia* 2:45–50.
- Peleg G, Lewis A, Linial M, Loew LM (1999) Nonlinear optical measurement of membrane potential around single molecules at selected cellular sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6700–6704.
- Per Andersen, Richard Morris, David Amaral, Tim Bliss JO (2007) *The Hippocampus Book* (Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O’Keefe J, eds). Oxford University Press.
- Peterka DS, Takahashi H, Yuste R (2011) Imaging voltage in neurons. *Neuron* 69:9–21.
- Petrovic MM, Nowacki J, Olivo V, Tsaneva-Atanasova K, Randall AD, Mellor JR (2012) Inhibition of post-synaptic  $K_{v7}$ /KCNQ/M channels facilitates long-term potentiation in the hippocampus. *PLoS One* 7:e30402.
- Porter JT, McCarthy KD (1996) Hippocampal astrocytes in situ respond to glutamate released from synaptic terminals. *J Neurosci* 16:5073–5081.
- Poskanzer KE, Yuste R (2011) Astrocytic regulation of cortical UP states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:18453–18458.
- Prakash N, Uhlemann F, Sheth SA, Bookheimer S, Martin N, Toga AW (2009) Current trends in intraoperative optical imaging for functional brain mapping and delineation of lesions of language cortex. *Neuroimage* 47 Suppl 2:T116–T126.
- Price EM, Lingrel JB (1988) Structure-function relationships in the  $Na^+,K^+$ -ATPase  $\alpha$  subunit: site-directed mutagenesis of glutamine-111 to arginine and asparagine-122 to aspartic acid generates a ouabain-resistant enzyme. *Biochemistry* 27:8400–8408.
- Purhonen P, Thomsen K, Maunsbach AB, Hebert H (2006) Association of renal Na,K-ATPase  $\alpha$ -subunit with the  $\beta$ - and  $\gamma$ -subunits based on cryoelectron microscopy. *J Membr Biol* 214:139–146.
- Puscas I, Coltau M, Baican M, Pasca R, Domuta G (1999) The inhibitory effect of diuretics on carbonic anhydrases. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 105:213–236.
- Qiu Z, Dubin AE, Mathur J, Tu B, Reddy K, Miraglia LJ, Reinhardt J, Orth AP, Patapoutian A (2014) SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel. *Cell* 157:447–458.

- Rector DM, Poe GR, Kristensen MP, Harper RM (1997) Light scattering changes follow evoked potentials from hippocampal Schaeffer collateral stimulation. *J Neurophysiol* 78:1707–1713.
- Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipilä S, Payne J a, Minichiello L, Saarma M, Kaila K (2004) Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci* 24:4683–4691.
- Roberts RC, Roche JK, McCullumsmith RE (2014) Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: a light and electron microscopic study. *Neuroscience* 277:522–540.
- Rose EM, Koo JCP, Antflick JE, Ahmed SM, Angers S, Hampson DR (2009) Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J Neurosci* 29:8143–8155.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713–725.
- Rusakov DA, Zheng K, Henneberger C (2011) Astrocytes as regulators of synaptic function: a quest for the  $\text{Ca}^{2+}$  master key. *Neuroscientist* 17:513–523.
- Santello M, Cali C, Bezzi P (2012) Gliotransmission and the tripartite synapse. *Adv Exp Med Biol* 970:307–331.
- Scemes E, Spray DC (2012) Extracellular  $\text{K}^{+}$  and astrocyte signaling via connexin and pannexin channels. *Neurochem Res* 37:2310–2316.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2008) Action potential initiation and propagation in hippocampal mossy fibre axons. *J Physiol* 586:1849–1857.
- Schmitt A, Asan E, Lesch K-P, Kugler P (2002) A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system. *Neuroscience* 109:45–61.
- Schneider GH, Baethmann A, Kempfski O (1992) Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S334–S343.
- Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS (2013) Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Front Endocrinol (Lausanne)* 4:102.
- Schousboe A, Pasantes-Morales H (1992) Role of taurine in neural cell volume regulation. *Can J Physiol Pharmacol* 70:S356–S361.
- Schousboe A, Waagepetersen HS (2005) Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. *Neurotox Res* 8:221–225.
- Schultz C, Engelhardt M (2014) Anatomy of the hippocampal formation. *Front Neurol Neurosci* 34:6–17.



- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20:11–21.
- Sibille J, Pannasch U, Rouach N (2014) Astroglial potassium clearance contributes to short-term plasticity of synaptically evoked currents at the tripartite synapse. *J Physiol* 592:87–102.
- Somjen GG (1979) Extracellular potassium in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Physiol* 41:159–177.
- Stobart JL, Anderson CM (2013) Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci* 7:38.
- Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S (1989) Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* 339:597–603.
- Sun D, Jakobs TC (2012) Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *Neuroscientist* 18:567–588.
- Syková E, Vargová L, Kubinová S, Jendelová P, Chvátal A (2003) The relationship between changes in intrinsic optical signals and cell swelling in rat spinal cord slices. *Neuroimage* 18:214–230.
- Todd KJ, Serrano A, Lacaille J-C, Robitaille R (2006) Glial cells in synaptic plasticity. *J Physiol Paris* 99:75–83.
- Traynelis SF, Dingledine R (1988) Potassium-induced spontaneous electrographic seizures in the rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 59:259–276.
- Tsytsarev V, Pope D, Pumbo E, Yablonskii A, Hofmann M (2010) Study of the cortical representation of whisker directional deflection using voltage-sensitive dye optical imaging. *Neuroimage* 53:233–238.
- Tzingounis A V, Wadiche JI (2007) Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 8:935–947.
- Vanhatalo S, Palva JM, Holmes MD, Miller JW, Voipio J, Kaila K (2004) Infralow oscillations modulate excitability and interictal epileptic activity in the human cortex during sleep. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5053–5057.
- Verkhratsky a, Steinhäuser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev* 32:380–412.
- Verkhratsky A, Nedergaard M, Hertz L (2014) Why are Astrocytes Important? *Neurochem Res.*
- Verkhratsky A, Rodríguez JJ, Parpura V (2012) Calcium signalling in astroglia. *Mol Cell Endocrinol* 353:45–56.

- Viitanen T, Ruusuvuori E, Kaila K, Voipio J (2010) The  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporter KCC2 promotes GABAergic excitation in the mature rat hippocampus. *J Physiol* 588:1527–1540.
- Villalba-Galea CA, Sandtner W, Dimitrov D, Mutoh H, Knöpfel T, Bezanilla F (2009) Charge movement of a voltage-sensitive fluorescent protein. *Biophys J* 96:L19–L21.
- Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochem Int* 36:291–300.
- Walz W, Ilschner S, Ohlemeyer C, Banati R, Kettenmann H (1993) Extracellular ATP activates a cation conductance and a  $K^+$  conductance in cultured microglial cells from mouse brain. *J Neurosci* 13:4403–4411.
- Walz W, Shargool M, Hertz L (1984) Barium-induced inhibition of  $K^+$  transport mechanisms in cortical astrocytes--its possible contribution to the large  $Ba^{2+}$ -evoked extracellular  $K^+$  signal in brain. *Neuroscience* 13:945–949.
- Walz W, Wuttke WA (1999) Independent mechanisms of potassium clearance by astrocytes in gliotic tissue. *J Neurosci Res* 56:595–603.
- Wang F, Smith NA, Xu Q, Fujita T, Baba A, Matsuda T, Takano T, Bekar L, Nedergaard M (2012) Astrocytes modulate neural network activity by  $Ca^{2+}$ -dependent uptake of extracellular  $K^+$ . *Sci Signal* 5:ra26.
- Wang HS, Dixon JE, McKinnon D (1997) Unexpected and differential effects of  $Cl^-$  channel blockers on the  $K_{v4.3}$  and  $K_{v4.2}$   $K^+$  channels. Implications for the study of the  $I_{to2}$  current. *Circ Res* 81:711–718.
- Wang J, Velotta JB, McDonough AA, Farley RA (2001) All human  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit isoforms have a similar affinity for cardiac glycosides. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1336–C1343.
- Wankhede M, Agarwal N, Fraga-Silva R a, DeDeugd C, Raizada MK, Oh SP, Sorg BS (2010) Spectral imaging reveals microvessel physiology and function from anastomoses to thromboses. *J Biomed Opt* 15:011111.
- White SR, Duffy P, Kalivas PW (1994) Methylenedioxymethamphetamine depresses glutamate-evoked neuronal firing and increases extracellular levels of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens in vivo. *Neuroscience* 62:41–50.
- Willadt S, Nenniger M, Vogt KE (2013) Hippocampal feedforward inhibition focuses excitatory synaptic signals into distinct dendritic compartments. *PLoS One* 8:e80984.
- Wu L-J, Steenland HW, Kim SS, Isiegas C, Abel T, Kaang B-K, Zhuo M (2008) Enhancement of presynaptic glutamate release and persistent inflammatory pain by increasing neuronal cAMP in the anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 4:40.
- Xing D, Yeh C-I, Shapley RM (2009) Spatial spread of the local field potential and its laminar variation in visual cortex. *J Neurosci* 29:11540–11549.

- Yan Y, Dempsey RJ, Sun D (2001) Expression of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter in rat brain during development and its localization in mature astrocytes. *Brain Res* 911:43–55.
- Ye Z-C, Oberheim N, Kettenmann H, Ransom BR (2009) Pharmacological “cross-inhibition” of connexin hemichannels and swelling activated anion channels. *Glia* 57:258–269.
- Zepeda A, Arias C, Sengpiel F (2004) Optical imaging of intrinsic signals: recent developments in the methodology and its applications. *J Neurosci Methods* 136:1–21.
- Zerangue N, Kavanaugh MP (1996) Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* 383:634–637.
- Zhang M, Li W-B, Liu Y-X, Liang C-J, Liu L-Z, Cui X, Gong J-X, Gong S-J, Hu Y-Y, Xian X-H (2011) High expression of GLT-1 in hippocampal CA3 and dentate gyrus subfields contributes to their inherent resistance to ischemia in rats. *Neurochem Int* 59:1019–1028.
- Zhou M, Xu G, Xie M, Zhang X, Schools GP, Ma L, Kimelberg HK, Chen H (2009) TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 29:8551–8564.
- Zhou Y, Wang X, Tzingounis A V, Danbolt NC, Larsson HP (2014) EAAT2 (GLT-1; slc1a2) glutamate transporters reconstituted in liposomes argues against heteroexchange being substantially faster than net uptake. *J Neurosci* 34:13472–13485.
- Zhu L, Polley N, Mathews GC, Delpire E (2008) NKCC1 and KCC2 prevent hyperexcitability in the mouse hippocampus. *Epilepsy Res* 79:201–212.

## 9 KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Doktori munkám elvégzéséhez nyújtott segítségéért köszönettel tartozom:

Dr. Héja Lászlónak

Dr. Kardos Juliannának

Dr. Nyitrai Gabriellának

Dr. Molnár Tündének

Kutiné Fekete Erzsébetnek

Kékesi Orsolyának

Dr. Ioja Enikőnek

Dr. Szabó Zsoltnak

Dr. Ulbert Istvánnak

valamint az MTA TTK Funkcionális Farmakológiai Kutatócsoportjában dolgozó valamennyi munkatársnak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni szüleimnek, páromnak és barátaimnak a támogatásukat.

## 10 MELLÉKLET

**1. melléklet.** A táblázat a mezőpotenciál jel és az ezzel egy időben detektált IOS és VSD jelek amplitúdóját mutatja a vizsgált régiókban az első oszlopban feltüntetett vegyületek alkalmazása alatt, kontroll százalékban kifejezve. Mezőpotenciál jelet csak a CA1 régióban mértem. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt).

	Mezőpotenciál jel amplitúdója		Optikai jelek amplitúdója					
	CA1		CA1		CA3		DG	
Alkalmazott vegyület/ek	VSD	IOS	VSD	IOS	VSD	IOS	VSD	IOS
5 $\mu$ M TTX	0 $\pm$ 1,2*	0 $\pm$ 1,6*	1,0 $\pm$ 0,4*	0,3 $\pm$ 0,3*	0,8 $\pm$ 0,3*	0,0 $\pm$ 0,0*	0,7 $\pm$ 0,4*	0,2 $\pm$ 0,1*
100 $\mu$ M picrotoxin	311,8 $\pm$ 20,4*	357,1 $\pm$ 25,6*	181,9 $\pm$ 11,6*	135,1 $\pm$ 16,8*	168,4 $\pm$ 9,8*	136,6 $\pm$ 10,5*	153,3 $\pm$ 10,5*	200,4 $\pm$ 27,4*
20 $\mu$ M CNQX	13,4 $\pm$ 1,2*	29,2 $\pm$ 3,1*	12,7 $\pm$ 3,5*	31,8 $\pm$ 4,5*	35,9 $\pm$ 8,5*	49,3 $\pm$ 8,5*	31,2 $\pm$ 12,7*	48,6 $\pm$ 6,2*
100 $\mu$ M APV & 20 $\mu$ M CNQX	11,9 $\pm$ 1,2*	6,5 $\pm$ 0,7*	7,4 $\pm$ 1,9*	15,8 $\pm$ 5,9*	32,0 $\pm$ 6,7*	23,4 $\pm$ 10,1*	32,3 $\pm$ 11,8*	22,8 $\pm$ 5,5*
300 $\mu$ M DHK 5 perc	131,8 $\pm$ 5,5*	113,6 $\pm$ 5,9*	69,4 $\pm$ 2,1*	53,5 $\pm$ 7,8*	19,3 $\pm$ 1,4*	38,2 $\pm$ 3,9*	10,1 $\pm$ 2,0*	31,2 $\pm$ 6,3*
300 $\mu$ M DHK 15 perc	82,0 $\pm$ 4,5*	73,6 $\pm$ 8,7*	53,6 $\pm$ 5,6*	34,5 $\pm$ 6,8*	14,5 $\pm$ 1,5*	28,2 $\pm$ 7,6*	10,2 $\pm$ 3,2*	21,5 $\pm$ 6,5*
5 mM furoszemid 5 perc	163,6 $\pm$ 8,9*	238,5 $\pm$ 33,8*	140,0 $\pm$ 6,3*	62,5 $\pm$ 6,3*	140,6 $\pm$ 5,1*	64,1 $\pm$ 4,5*	128,9 $\pm$ 10,2*	41,2 $\pm$ 11,5*
5 mM furoszemid 15 perc	67,9 $\pm$ 6,6*	83,4 $\pm$ 14,8*	132,3 $\pm$ 10,0*	27,2 $\pm$ 2,9*	136,9 $\pm$ 6,4*	23,1 $\pm$ 5,6*	107,5 $\pm$ 12,4*	16,8 $\pm$ 5,9*
10 $\mu$ M bumetanid	110,1 $\pm$ 2,0*	88,9 $\pm$ 2,5*	110,4 $\pm$ 3,1*	103,5 $\pm$ 5,1	97,3 $\pm$ 4,0	102,0 $\pm$ 5,4	76,7 $\pm$ 6,9*	84,0 $\pm$ 13,0
500 $\mu$ M BaCl <sub>2</sub>	185,4 $\pm$ 10,9*	135,9 $\pm$ 7,6*	96,9 $\pm$ 11,1	124,7 $\pm$ 7,0*	70,6 $\pm$ 4,6*	107,9 $\pm$ 7,3	44,6 $\pm$ 5,6*	101,3 $\pm$ 7,8
3 $\mu$ M ouabain 5 perc	146,8 $\pm$ 7,1*	165,9 $\pm$ 13,3*	97,7 $\pm$ 2,5	110,5 $\pm$ 7,8	89,6 $\pm$ 4,3*	99,1 $\pm$ 5,2	64,7 $\pm$ 8,5*	90,0 $\pm$ 7,4
3 $\mu$ M ouabain 15 perc	75,1 $\pm$ 9,0*	209,7 $\pm$ 26,3*	53,6 $\pm$ 13,4*	86,5 $\pm$ 10,5	30,7 $\pm$ 12,1*	74,8 $\pm$ 10,4	28,6 $\pm$ 9,9*	60,1 $\pm$ 7,8*
200 $\mu$ M DIDS	191,2 $\pm$ 8,5*	153,2 $\pm$ 11,1*	119,5 $\pm$ 2,9*	79,6 $\pm$ 8,8*	113,6 $\pm$ 3,2*	67,2 $\pm$ 9,0*	126,9 $\pm$ 5,1*	77,5 $\pm$ 14,6*
322 $\mu$ M fluorocitrát	172,9 $\pm$ 8,2*	139,8 $\pm$ 7,2*	68,1 $\pm$ 10,6*	109,9 $\pm$ 9,1	49,6 $\pm$ 10,5*	94,7 $\pm$ 5,0	53,0 $\pm$ 16,9*	76,7 $\pm$ 9,4
100 $\mu$ M NPPB 5 perc	-	72,4 $\pm$ 5,6*	-	72,5 $\pm$ 5,3*	-	71,4 $\pm$ 5,0*	-	82,6 $\pm$ 5,4*
100 $\mu$ M NPPB 15 perc	-	12,7 $\pm$ 2,4*	-	28,7 $\pm$ 4,9*	-	30,6 $\pm$ 6,4*	-	38,7 $\pm$ 9,9*
40 $\mu$ M DCPIB	-	98,9 $\pm$ 2,1	-	109,6 $\pm$ 3,6*	-	106,8 $\pm$ 3,5*	-	111,0 $\pm$ 10,5*
100 $\mu$ M MRS2179	-	77,1 $\pm$ 4,2*	-	76,3 $\pm$ 7,6*	-	88,3 $\pm$ 8,0*	-	91,1 $\pm$ 20,0*

**2. melléklet.** A táblázat a különböző molekuláris célponton ható inhibitorok hatásának különbségeit mutatja a mezőpotenciál jel, az IOS és a VSD jelek amplitúdóján. Az adatokat az alkalmazott vegyület kontroll %-ban kifejezett hatásának hányadosaként adtam meg a megadott jelek amplitúdóján, a különböző vizsgált régiókban. Csillaggal jelöltem azokat az oszlopokat ahol az érték szignifikánsan különbözött a kontrolltól ( $p < 0,05$  Mann-Whitney U teszt).

Molekuláris célpont (inhibitor)	VSD jel ampl. Mezőpot. jel ampl.	IOS ampl. Mezőpot. jel ampl.	IOS ampl. VSD jel ampl.	IOS ampl. VSD jel ampl.	IOS ampl. VSD jel ampl.
	CA1	CA1	CA1	CA3	DG
<b>Kontroll</b>	0.92±0.04	1.02±0.05	1.09±0.05	1.06±0.06	1.03±0.05
<b>iGluR receptorok</b> (100 µM APV & 20 µM CNQX)	1.04±0.40	0.98±0.16	1.78±0.30*	0.55±0.22*	0.36±0.13*
<b>EAAT2</b> (300 µM DHK)	0.54±0.04*	0.53±0.06*	0.77±0.16	1.98±0.33*	5.68±2.02*
<b>KCC2 és NKCC1</b> (5 mM furoszemid)	0.86±0.08	0.47±0.08*	0.45±0.06*	0.46±0.04*	0.32±0.08*
<b>NKCC1</b> (10 µM bumetanid)	1.00±0.04	1.16±0.09	0.94±0.04	1.05±0.05	1.09±0.13
<b>Anion csatornák</b> (200 µM DIDS)	0.62±0.05*	0.52±0.07*	0.67±0.08*	0.59±0.08*	0.61±0.11*
<b>K<sub>ir4.1</sub></b> (500 µM BaCl <sub>2</sub> )	0.69±0.08	0.9±0.06	1.29±0.12	1.5±0.12*	3.03±0.75*
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPáz</b> (3 µM ouabain)	0.67±0.08	0.67±0.10	1.13±0.12	1.10±0.10	1.39±0.10*

### <sup>38</sup>ADATLAP

#### a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához

##### I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Pál Ildikó.....  
 MTKMT-azonosító: 10022719.....  
 A doktori értekezés címe és alcíme:  
 Idegi aktivitás térbeli követésére alkalmazott optikai jelek molekuláris komponenseinek azonosítása.....  
 DOI-azonosító<sup>39</sup>: 10.15476/ELTE.2015.023.....  
 A doktori iskola neve: ELTE Kémia Doktori Iskola.....  
 A doktori iskolán belüli doktori program neve: Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia.....  
 A témavezető neve és tudományos fokozata: Héja László PhD.....  
 A témavezető munkahelye: MTA Természettudományi Kutatóközpont, .....  
 A témavezető munkahelye: MTA Természettudományi Kutatóközpont, .....

##### II. Nyilatkozatok

A doktori értekezés szerzőjeként<sup>40</sup>

a) hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi Kar Tudományos-szervezési és Egyetemközi Kapcsolatok Osztályának ügyintézőjét BIRÓ ÉVA T....., hogy az értekezést és a téziseket feltöltsse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kiöltsse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;<sup>41</sup>

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés *(álkím)*-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;<sup>42</sup>

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé.

Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárulok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.<sup>43</sup>

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sérttem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: BUDAPEST, 2015. február 16.

.....  
 a doktori értekezés szerzőjének aláírása

<sup>38</sup> Belkattatta az Egyetemi Doktori Szabályzat módosításáról szóló CXXXIX/2014. (VI. 30.) Szen. sz. határozat. Hatályos: 2014. VII. 1. napjától.

<sup>39</sup> A kari hivatal ügyintézője tölti ki.

<sup>40</sup> A megfelelő szöveg aláhúzendő.

<sup>41</sup> A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell adni a tudományági doktori tanácshoz a szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentést tanúsító okiratot és a nyilvánosságra hozatal elhatalasítása iránti kérelmet.

<sup>42</sup> A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a minősített adatra vonatkozó közöklíratot.

<sup>43</sup> A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a mű kiadásáról szóló kiadó szerződést.